



DEBRECENI EGYETEM

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Prof. Dr. Csapó János  
egyetemi tanár

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014

Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

SZÉCHENYI 2020



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

Európai Unió  
Európai Szociális  
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

**A folyadékkromatográfia célja:** hasonló kémiai szerkezetű vegyületek térbeli elválasztása és mennyiségi, valamint minőségi jellemzése a retenciós idő és a csúcsterület (magasság) – koncentráció összefüggés alapján.



**Egy mai, modern nagyhatékonyságú folyadékkromatográf**



TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Elválasztástechnika – komponensek térbeli elkülönítése

Réteg kromatográfia: 1930-tól.

Gázkromatográfia: 1959-től.

**Modern folyadékkromatográfia:** 1970-től. Hatékony oszlopok, nagynyomású pumpák fejlesztése, átfolyó cellás detektorok.

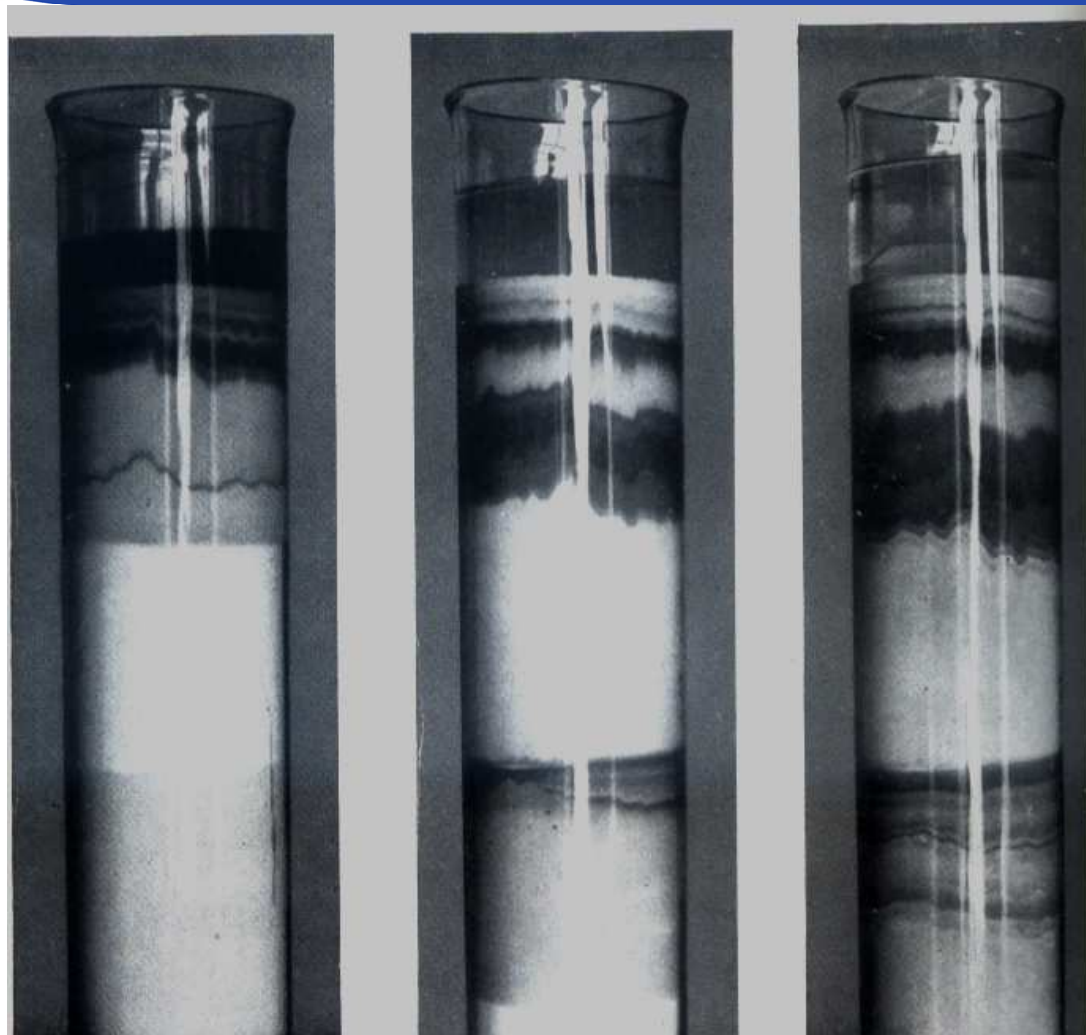
**Fajtái:** analitikai ( $\mu\text{g/ml}$  –  $\text{pg/ml}$ ),  
félpreparatív ( $\mu\text{g}$  –  $\text{g}$ ),  
preparatív ( $\text{g}$  –  $\text{kg}$ ).

#### Az adott komponens meghatározásának alapfeltétele:

Oldékonyság az eluensben,  
detektálhatóság .



## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI



1.

2.

3.

**Petroléterrel nyert nyers  
paprika extraktum  
kromatografálása kalcium-  
karbonát oszlopon.**

1. Az extraktum oszlopra történő töltése után azonnal.
2. Nem megfelelő elválasztás után petroléterrel.
3. Tökéletes kifejlesztés után.

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Folyadékkromatográfiás eljárások

Normál fázisú folyadékkromatográfia	(Normal-phase) NP-HPLC
Fordított fázisú folyadékkromatográfia	(Reverse-phase) RP-HPLC
Fordított fázisú ionpár kromatográfia	(Reverse-phase ionpair) RP-IP-HPLC
Ioncserés folyadékkromatográfia	(Ion-exchange chrom.) IEC
Méretkizárásos folyadékkromatográfia	(Size exclusion chrom.) SEC
Királis folyadékkromatográfia	(Chiral chromatography) CC
Affinitás folyadékkromatográfia	(Affinity chromatography) AC



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### A vizsgálandó komponens és az állófázis között fellépő kölcsönhatások

Ionos (Ioncserés).

Dipólus - Dipólus (Normál fázisú).

Intermolekuláris erők, amelyek poláris molekulák pozitív és negatív dipólus momentumai között alakulnak ki.

Dipólus - Indukált Dipólus (Normál fázisú).

Dipólus momentummal nem rendelkező molekulákban poláris molekulák ideiglenesen dipólus momentumot indukálhatnak az elektronok szimmetrikus elrendeződését megbontva.

Hidrofób (Fordított fázisú).

Sztereospecifikus (Királis).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Normál fázisú folyadékkromatográfia

A folyadékkromatográfias módszerek egyik osztályozása a polaritás viszony szerinti.

Megállapodás szerint, ha **az álló fázis polárisabb, mint a mozgó fázis** NP-HPLC-ről beszélünk

Apoláris vagy kevésbé poláris vegyületek meghatározására alkalmazzák.

Hexán oldható vegyületek.

Helyzeti izomerek elválasztására.

### Állófázisok

Szilikagél (40-50%).

Alumínium-oxid (3-10%).

Királis állófázis (20-25%).

Módosított szilikagél (pl.  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{NO}_2$ , diol).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

Poláris (specifikus, de nem ionos) kölcsönhatás a vegyületek és az állófázis poláris csoportjai között (SiOH, -NH<sub>2</sub>, -CN, Diol), ami retencióhoz vezet.

Különböző adszorpciós affinitású molekulák különböző retencióval jelentkeznek (minél polárisabb egy vegyület, annál nagyobb retenciós ideje lesz).

Több poláris funkciós csoportot tartalmazó vegyületek többet tartózkodnak az állófázison.

A helyzeti izomerek elválasztására is lehetőség van.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Fordított fázisú kromatográfia

Megállapodás szerint ha **az álló fázis apolárisabb mint a mozgó fázis** RP-HPLC-ről beszélünk.

A leggyakrabban alkalmazott folyadékkromatográfias módszer (elválasztások 80%-a).

#### Állófázisok:

Szilikagél alapú; (80-90%) (pH = 2–8).

Szerves polimer alapú; (5-10%) (pH = 1–14).

Egyéb (szén alapú, zeolit, alumínium-oxid alapú; 2-10%).

#### Állófázisokkal szemben támasztott követelmények:

Energetikailag homogén.

Homogén, kis eloszlású pórusszerkezet (mikropórus mentes).

Apoláris.

Mechanikai stabilitás (bírnak a 200-300 bar nyomást).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### **Szilikagél alapú állófázisok (a leggyakrabban alkalmazott)**

A pH alkalmazhatóság felső határa 8-9, a szilikagél oldhatósága miatt, utószilanizálással  $\text{pH} \approx 10$ .

A pH alkalmazhatóság alsó határa 1-2, a felvitt módosító csoportok hidrolízise miatt, amit fémszennyeződések jelenléte tovább gyorsít.

### **Módosított szilikagél (monomer)**

A módosítás célja a szilikagél polaritásának megváltoztatása.

### **A módosítás alapján lehetnek:**

Monomer (klór-szilánokkal módosított).

Átmeneti (bifunkciós klór-szilánokkal módosított).

Polimer módosítás (trifunkciós klór-szilánokkal módosított).



## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Módosított szilikagél

**A szabad-szilanol csoportok hozzáférhetősége függ:**

Pórusszerkezettől (pl. „tintasüveg” pórusban reagálatlanul maradt  $-OH$ ).

Mozgófázis összetételétől ( $C_{18}$  lánc helyezkedése).

A kialakított fordított fázis jellemezhető a hidrofób ( $C_{18}$ ) és hidofil ( $-OH$ ) felület arányával.

Ezt az arányt kontrollálni kell mert eltérő energetikai viszonyok rontják az elválasztás hatékonyságát.

Fémszennyeződések elősegítik a  $-OH$  csoport disszociációját, célszerű fémion mentes szilikagélt módosítani.

### Fémtartalom szerint:

I. generációs szilikagélek (fémion tartalom 150-200 mg/kg),

II. generációs szilikagélek (fémion tartalom 10-100 mg/kg),

III. generációs szilikagélek (fémion tartalom  $<1$  mg/kg).

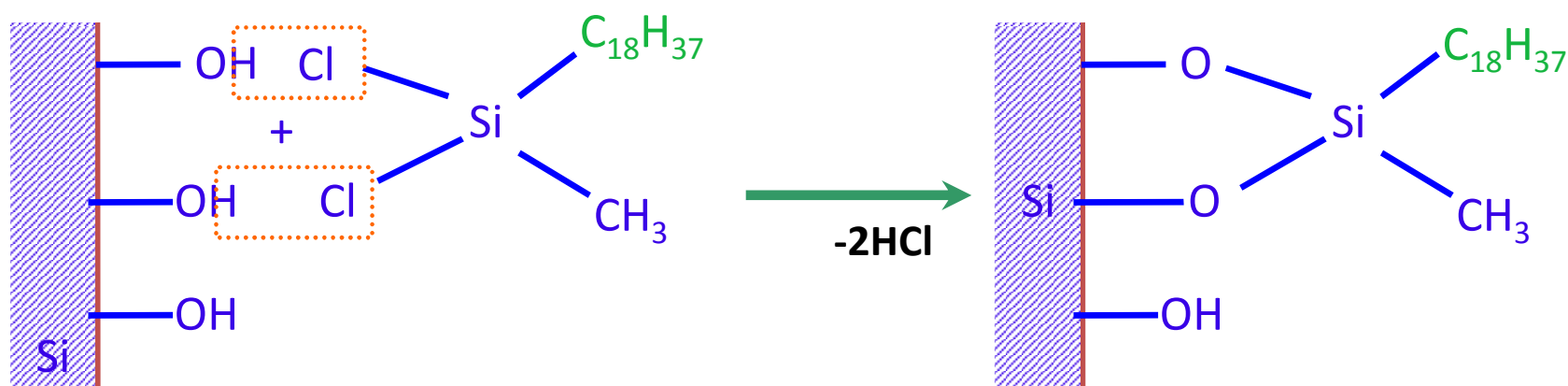


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Módosított (átmeneti) szilikagél

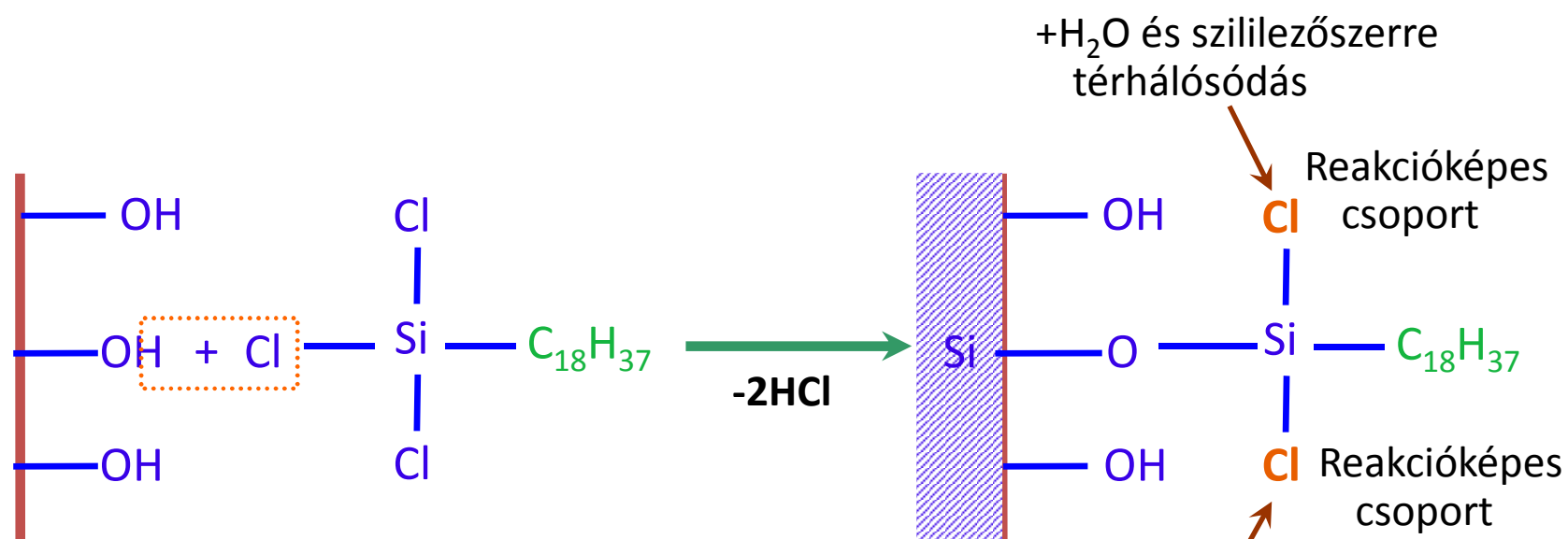
Ha a szabad szilanol csoportokat bifunkciós klórszilánnal reagáltatjuk az alábbi reakció játszódhat le:



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

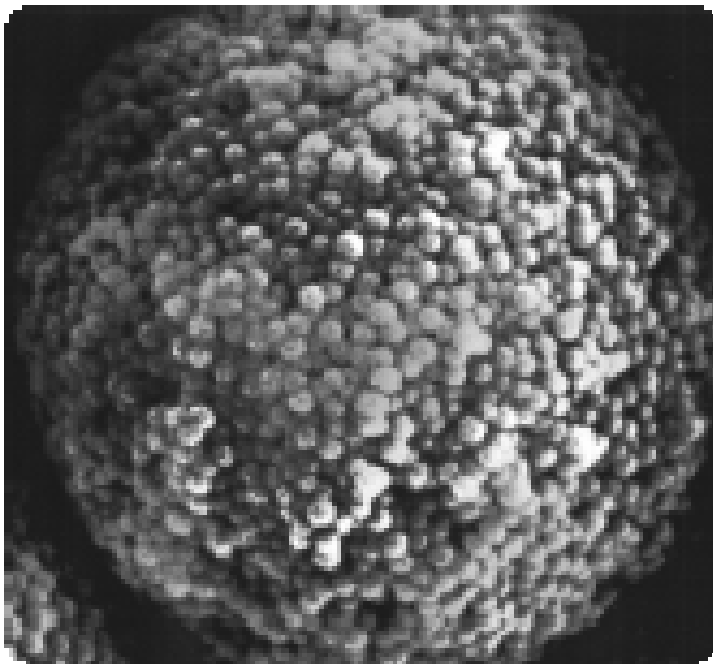
Ha a szabad szilanol csoportokat trifunkciós klór-szilánnal módosítjuk, az eredmény egy térhálós polimer.



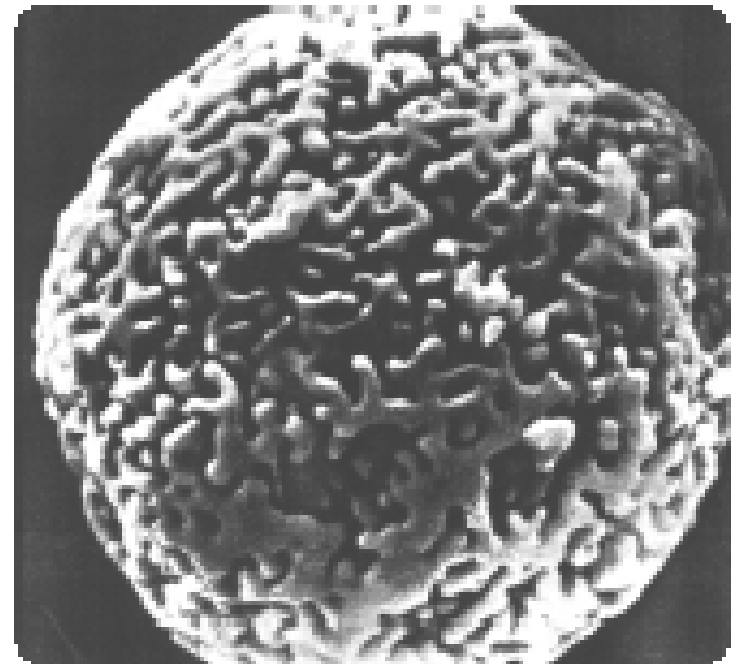
# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

**Különböző szilikagél fajták elektronmikroszkópos képe**



**Kemény szilikagél**



**Lágy szilikagél**

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

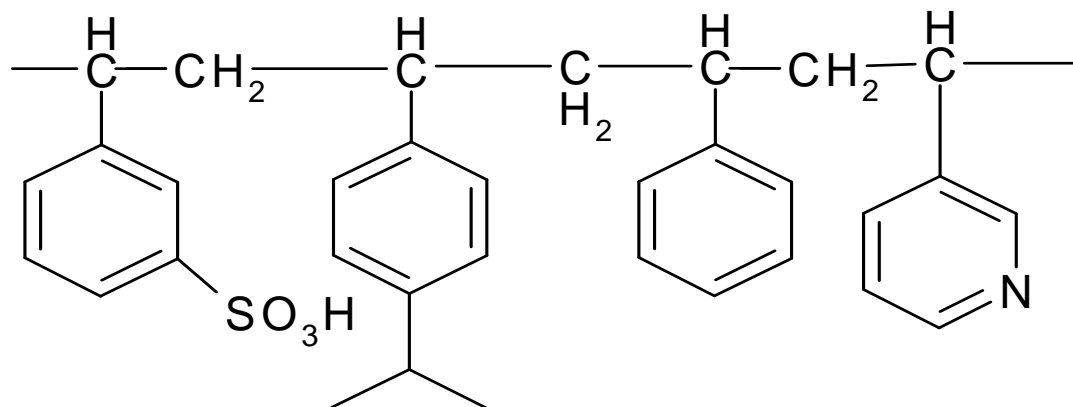
### Szerves polimer alapú állófázisok

A teljes pH tartományban alkalmazhatóak. Térhálós szerkezetűeknek tulajdoníthatóan nagy mechanikai stabilitással rendelkeznek.

Mikropórusok képződése elkerülhetetlen, így kinetikai hatékonyságuk kisebb mint a szilikagél alapú állófázisoké.

A szerves polimert oldó oldószerek (klórozottak) duzzasztják a polimert, ettől összeroppan.

Apoláris jelleg csökkentésére módosítják a polimert (pl. szulfonil, piridin).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Szén alapú állófázisok

Hasonló viselkedést mutat a nagypórusú szilikagélhez, de 100% szén.

Egyéni retenció mechanizmus. (Nincs eluotróp oldószer sor), az NP és RP oldószereit egyaránt használni lehet.

Stabilitás jellemzi (extrém pH: 0-14, hőmérséklet és só koncentrációk).

Minél polárisabb egy vegyület annál nagyobb retenciót mutat Hypercarb oszlopon ("polar retention effect on graphite" vagy PREG effektus).

Ezért alkalmas erősen poláris vegyületek elválasztására (OH, COOH vagy NH csoportot tartalmazó vegyületek).

Alkalmas geometriai izomerek, diasztereoizomerek, szénhidrátok, PCB-ok elválasztására is.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Szerves polimer alapú állófázisok

#### Előnyök:

Széles pH tartomány (1-14).

Szemcseméret eloszlás jó.

Energetikailag gyenge kölcsönhatások (RP).

Hosszú élettartam.

Reprodukálható sarzsok.

#### Hátrányok:

Kisebb hatékonyság.

Egyensúly beállítás lassú.

Nehezen nedvesíthető.

Klórozott oldószerek károsítják.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### **Mozgó fázisok az RP-HPLC-ben**

#### **Általános követelmények:**

Polárisabb legyen az állófázisnál.

Tisztaság (pl. Gradient grade, Hypergrade).

Minél alacsonyabb UV cut-off (jó fényáteresztő képesség).

Kis viszkozitás.

Jó oldószere legyen a mintának.

Toxikusság.

Detektor kompatibilis (pl. pufferek a tömegdetektorban).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### A pH szerepe az RP-HPLC-ben

**A pH szempontjából négy csoportba soroljuk a vegyületeket:**

Semleges.

Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek.

Bázikus jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek.

Ionos, ionizálható vegyületek.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Semleges vegyületek

A pH nem befolyásolja a molekula állapotát, ezért **nincs** szükség a pH ellenőrzésére.

Polikondenzált aromások.

Halogénezett aromás vegyületek.

Alkoholok.

Éterek.

Ketonok.

Aldehydelek.

(Poliaromás szénhidrogének – PAH-ok).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### **Savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek**

A pH befolyásolja a molekula állapotát, ezért fontos a pH ellenőrzése (karbonsavak, aminosavak).

### **Bázikus jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek**

A pH befolyásolja a molekula állapotát, ezért fontos a pH ellenőrzése (aminok, aminosavak).

### **A pH kontroll pufferek segítségével történik**

Puffer pH-ja (2-10), a puffer koncentrációja (2 mM-0,2 M tartományban).

### **Gyakran használt pufferek:**

Foszfát, Citrát, Acetát, Formiát

Trisz(hidroximetil)-aminometán.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### **A pufferekkel szemben támasztott követelmények:**

A puffer UV cut-off-ja kisebb mint a detektálási hullámhossz.

Szilárd szennyeződés mentes.

Adott pH-án mikroorganizmusok (alga, baktérium) képződése.

Puffer kompatibilitás a szerves oldószerekkel (kicsapódik magas szerves oldószertartalomnál; a szerves pufferek oldékonysága nagyobb).

A minta stabilitása nagy legyen az adott pufferben.

Puffer mentesítés (vízzel kezdjük majd szerves oldószerral).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### A visszatartást befolyásoló tényezők

Növekvő pH.

Nő a savak ionizációja – nő a visszatartás.

Csökken a bázikus vegyületek ionizációja – gyorsan eluálódnak.

Puffer erősség nő.

Ioncserélő felületeken megnő a versengés – csökken a retenció.

Nő a hőmérséklet.

Egyensúly kedvez a mozgó fázisnak – csökken a retenció.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### A folyadékkromatográfia alkalmazási területei

#### Gyógyszeripar

Hatóanyag-tartalom vizsgálat.

Szennyezők és vagy bomlástermékek vizsgálata.

Metabolizmus vizsgálat.

Farmakokinetika.

Kombinatorikus kémia.

#### Élelmiszer-tudomány, -technológia, -biztonság

Élelmiszer adalékok (vitaminok; E-vegyületek; tartósítószer).

Toxinok (aflatoxinok, ochratoxin).

Aminosavak, peptidek, fehérjék.

Cukrok (fruktóz, glükóz, szacharóz, galaktóz) és cukoralkoholok.

Gyógyszermaradékok.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### **Környezet analitika**

Poliaromás szénhidrogének.

Peszticidek.

Nem-ionos felületaktív anyagok.

### **Klinikai vizsgálatok**

Metabolikus rendellenességek vizsgálata.

Tumormarkerek azonosítása.

Neurotranszmitterek (acetilkolin, dopamin).

### **Bűnügyi vizsgálatok**

Kábítószer (kokain, amfetaminok).

Dopping szerek (szteroidok).

Robbanószer maradékok.



## A kromatográfiás eljárások során működő erők

### Adszorpció

A kromatográfiás módszerek adszorpciós és megoszlási folyamatokkal járnak együtt.

A heterogén rendszerek határfelületén működő erők → egyik fázis felületén a vele érintkező másik fázis molekuláit kisebb-nagyobb mértékben képesek megkötni.

A fázis felületén a komponens koncentrációja nagyobb, mint a folyékony fázisban → a jelenség az **adszorpció**, az anyag, amelynek felülete a másik fázis molekuláit megköti az **adszorbens**, a felületen megkötött anyag az **adszorptívum**.

**Az adszorpció:** az adszorbens felületén lévő molekulák és az adszorptívum molekulái között erők hatnak → az adszorptívum molekuláinak egy részét az adszorbens felületére vonzzák.

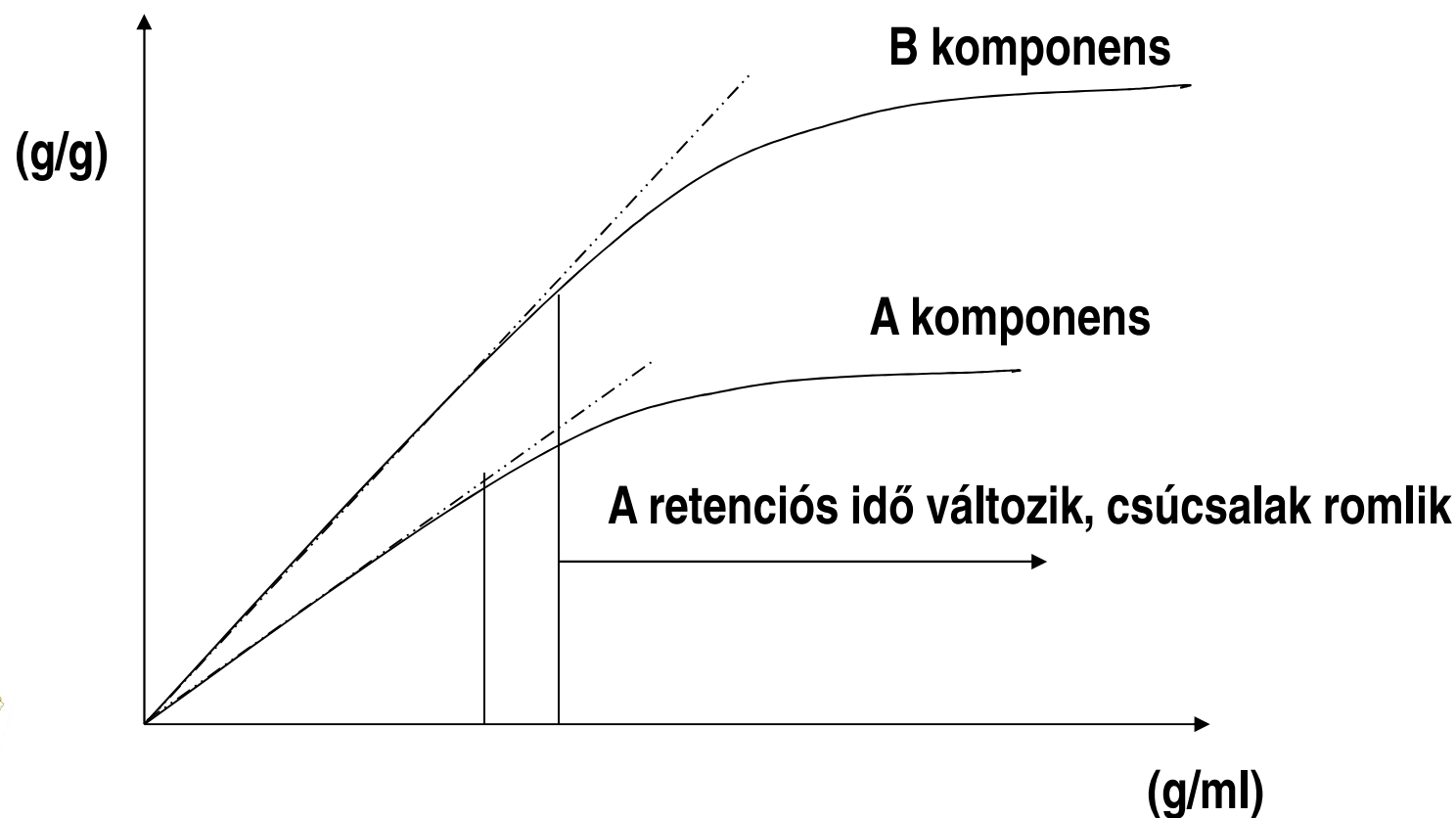
**Adszorpciókor:** az erők az adszorptívum molekuláinak hőmozgása ellenében munkát végeznek, ami az **adszorpciós hő** alakjában szabadul fel.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A KROMATOGRÁFIA ELVI ALAPJAI

### Adszorpciós izoterma egy A és B anyagra



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az adszorbeált molekuláknak az adszorbens felületéről való eltávolítása, a **deszorpció**, lehűléssel jár → az adszorpció exoterm, a deszorpció endoterm folyamat.

Az adszorpció **dinamikus jelenség** → az adszorbeált felületi réteg, és az adszorbeálatlan molekulák között kicserélődés megy végbe.



Az adszorptívum molekulái a hőmozgás következtében részben deszorbeálódnak.



Az adszorbeálatlan molekulák az adszorpciós erők hatására megkötődnek.



Az **adszorpciós egyensúly**: az időegységenként megkötött molekulák száma azonos a felületről leváló molekulák számával.



## Az adszorpciós folyamatok egymással érintkező fázisok halmazállapota szerint:

szilárd adszorbens – gáz-halmazállapotú adszorptívum

szilárd adszorbens – folyékony adszorptívum

folyékony adszorbens – gáz-halmazállapotú adszorptívum

folyékony adszorbens – folyékony adszorptívum



## Adszorpció szilárd-folyadék határfelületen

Nagy fajlagos felületű szilárd testek egyes folyadékokat és oldott anyagokat is adszorbeálnak.

A tiszta folyadék adszorpciója → **lioszorpció**.

Az adszorbens felületén folyadékmolekulák kötődnek meg → **lioszférának** nevezett adszorpciós réteget hoznak létre.

Ha az adszorbeált réteg vízmolekulákból áll → hidroszféra, hidrátburok.

A folyadékadszorpció a szilárd és folyékony fázis anyagi természetétől függ:

A folyadékok amelyek nedvesítik az adszorbens felületét jól,  
amelyek nem nedvesítik rosszul, vagy egyáltalán nem adszorbeálódnak a szilárd fázison.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A folyadékok nedvesítőképesége a határfelületi feszültségtől függ → minél nagyobb a határfelületi feszültség, annál kevésbé nedvesedik az adszorbens.

Szenek és a víz közötti adszorpció hidrofób, apoláris (apoláros) jellegű.

Szilikagél és a víz között kicsi a határfelületi feszültség, a szilikagél kiválóan nedvesedik, vízzel érintkezve vastag hidrátburok jön létre.

## Oldatok adszorpciója

Az adszorbensek felületére mind az oldott anyag, mind az oldószer deszorbeálódhat.

Oldatban az adszorpciós viszony függ:

az oldószer és az adszorbens között milyen a határfelületi feszültség,  
az oldószer nedvesíti-e az adszorbens felületét.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az adszorbenst **rosszul nedvesítő** oldószerek esetén az oldott anyagok adszorbeálódnak.

Az adszorpció izotermákkal jellemezhető.

Az oldott anyagok adszorpciójának mértéke fordítottan arányos a rendszer hőmérsékletével, egyenesen arányos az oldat koncentrációjával.

Az adszorbens telítődik, ha felületét monomolekuláris adszorptívumréteg fedi be.

Az oldatokban lejátszódó adszorpció reverzibilis folyamat.

Ha az oldószer a szilárd fázist **jól nedvesíti**:

Alkalmatlan vízben oldott anyagok adszorpciójára.

Az oldószer nagymérvű adszorpciója miatt az adszorbens felületéről az oldott anyagok teljesen kiszorulnak.



**Negatív adszorpció.**

Az adszorbens és az adszorbeált anyag molekulái között a határfelületi erőkhöz kívül kémiai kölcsönhatás is kialakul.



**Kemoszorpció (nem reverzibilis).**





## Megoszlás

Megoszlási hányados:

ahol:

K: megoszlási hányados,

$c_1$ : az oldott anyag koncentrációja az egyik oldószerben,

$c_2$ : az oldott anyag koncentrációja a másik, vele egyensúlyban levő oldószerben.

$$K = \frac{c_1}{c_2}$$

**A megoszlási hányados** híg oldatokban csak a résztvevők anyagi minőségétől és a hőmérséklettől függ, független a koncentrációtól.

**A megoszlási törvény érvényes**, ha az adott anyag molekuláris állapota mindkét oldószerben ugyanaz, sem a disszociációs, sem az asszociációs viszonyok nem változnak.



## A kromatográfiás módszerek csoportosítása

A kromatográfiás módszerek csoportosíthatók az **elválasztási mechanizmus, az álló fázis alakja és a fázisok halmazállapota szerint.**

### **Az elválasztás mechanizmusa alapján:**

Az elegy komponensei milyen erő hatására kötődnek fokozatosan az álló fázishoz:

- adszorpciós erők,
- megoszlás,
- ionok kicserélődési képessége,
- molekulaszűrőn való áthatolóképesség,
- biokémiai affinitás.

Többféle erőhatás is jelentkezhetsz egyszerre:

- adszorpció mellett ioncsere,
- gélészűrés mellett adszorpció.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## **Az álló fázis alakja alapján:**

háromdimenziós oszlopkromatográfia,  
kétdimenziós (réteg- és papír-) kromatográfia.

## **A fázisok halmazállapota szerint:**

gáz–szilárd (angol rövidítése GSC),  
folyadék–szilárd (LSC),  
gáz–folyadék (GLC),  
folyadék–folyadék (LLC).

## **Adszorpciós kromatográfia**

A szétválasztandó elegy egyes komponensei a nyugvó adszorbens felületén megkötődnek.

A továbbvándorló oldószertől, a kevésbé erősen adszorbeálódó oldott anyagoktól elkülönülnek.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

**Három lehetséges fajtája van:**

Elúciós módszer,  
frontális kromatográfia,  
kiszorításos módszer.

## Elúciós kromatográfia

**Műveleti fázisok:**

Az oldat betáplálása és az oldott anyag adszorbeálódása: **zónaképzés**.

A tiszta oldószer vagy oldószerkelet betáplálása, a zónát alkotó anyagok sávokra való különítése: **kifejlesztés**,

A sávok kioldása az adszorbensből: **elúció**.

**Zónaképzés:**

Az oldott anyagok egymástól függetlenül adszorbeálódnak.

Három összetevő esetén a zónák első részében mindhárom anyag jelen van, később kettő, és végül egy összetevő zónája figyelhető meg.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Kifejlesztés:

Az adszorbeált zónában található komponensek szétválasztását célozza:

Az oszlopra megfelelő oldószert öntünk,  
a tiszta oldószer a zónában az adszorbeált anyag egy részét deszorbeálja,  
az erősebben adszorbeálódott anyag lassabban halad előre,  
a kevert zónából egymástól mindig jobban elkülönülő sávok alakulnak ki.



A teljes elválás után egy-egy tiszta anyagot tartalmaznak.

Az oldat áthaladása közben az adszorpció és a deszorpció folyamata automatikusan ismétlődik → egyes komponensek adszorbeáló képességüktől függően elkülönülnek egymástól.

A komponensek szétválasztásának sikere függ az adott rendszeren belül az egyes komponensek adszorpciós tulajdonságaitól, milyen típusú izotermák jellemzik.

Eredményes kifejlesztés után a zóna anyagai teljesen elkülönülnek egymástól → mindegyik sáv csak egy oldott anyagot tartalmaz.

## Adszorbensek

Nagy fajlagos felületű, szemcsés szerkezetű vagy porszerű hidrofil, illetve hidrofób jellegű anyagok.

Minőségüket meghatározza:

- szelektivitás,
- kapacitás,
- aktivitás.

**Szelektív:** képes az analízisben felhasznált anyagkeverékek egyes komponenseinek elkülönített adszorpciójára.

Az adszorbens **kapacitása:** a tömegegysége által adszorbeált mennyiség.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Aktivitás:

Az adszorbens visszatartó képessége, retenciós sajátága a kötőkéesség erősségét jellemzi.

A **nagyon aktív adszorbensekből** az adszorbeált anyagokat nehéz visszanyerni, a kromatogram kifejlesztése is nehéz.

A **kevésbé aktív adszorbensen** nem következik be szeparáció.

Az adszorbensek aktivitása kémiai szerkezetüktől és felületük morfológiájától függ.

**Ideális adszorbens szelektivitása és szelektív adszorpciós kapacitása nagy, aktivitása közepes.**

## Szemcsenagyság:

Az elválasztás sikerét nagymértékben befolyásolja.

Kisebb részecskék esetén gyorsabban áll be az egyensúly, kevésbé zavar a diffúzió hatása.

Túl **finom részecskék** esetén nagyon megnő az oszlop ellenállása a folyadék áramlásával szemben.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Legmegfelelőbb szemcsenagyság 2–15  $\mu\text{m}$ .

Fontos követelmény, hogy az adszorbensek ne reagáljanak az oldószerekkel, a kromatografálandó elegy alkotóival.

Az adszorbensek a vízhez való viszonyuk alapján:

Hidrofil (poláris)  $\rightarrow$  nagy az affinitásuk a vízhez.

Hidrofób (apoláris)  $\rightarrow$  nagyon kicsi az affinitásuk a vízhez.

## Eluálószer

Az adszorbens felületén az oldószer molekulái és az adszorptívum molekulái versengenek a megkötődésért.

Az a komponens adszorbeálódik jobban, amelyiknek nagyobb az affinitása az adszorbenshez.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az adszorbenseket az adszorpció sorrendbe állítva kapjuk az **eluotrop sort**.

Az eluotrop sor utolsó tagjai a legjobb eluensek.

Az első tagok vagy ezek keverékei a kromatográfiás szétválasztáshoz alkalmas zónaképző oldószerek, futtatószer.

Apoláris adszorbenseknél az eluotrop sor fordítva érvényes.

## A legjobb oldószer kiválasztása:

Az oldószerben a szétválasztandó minta oldható legyen.

Legmegfelelőbb eluens, amelyből az elegy közepes erősséggel adszorbeálódik.

Érvényesüljön megfelelően az egyes alkotók különböző adszorptivitása.

Az eluotrop sor egyes tagjai közötti különbséget csökkenteni kell, ha közeli adszorptivitású anyagokat akarunk szétválasztani.

A sor két-három szomszédos oldószerének keverékét használjuk.

Az oldószerek legyenek nagyon tiszták.



## Frontális kromatográfia

Több oldott anyagot tartalmazó elegy átfolyik az előzőleg tiszta oldószerrel átnedvesített adszorbens oszlopon.



Először a tiszta oldószer jelenik meg.



Egymást követően jelennek meg az adszorbeált anyagok, adszorptivitásuktól függően.

A leggyengébben adszorbeálódó anyag jelenik meg először.

A kifejlesztés alatt az egyes komponensek csak részlegesen különülnek el egymástól, részben egyidejűleg lépnek ki az oszlopról.



## Kiszorításos kromatográfia

Az oldott anyagok az oszlop felső részén zónát képeznek.



Áramoltassunk kiszorítóoldatot (erősebben adszorbeálódik, mint a zóna anyagai közül bármelyik).



A kiszorítóanyag elmozdítja az egyik komponenst, ugyanezt teszi a kevésbé adszorbeálódóval.



A kiszorítás folyamán lefolyó oldatban először az első anyag jelenik meg tisztán → a második anyag ugyancsak tisztán → kiszorítóanyag következik.



## Oszlopkromatográfia

### Eszközei:

Üvegből készült csövek,  
beforrasztott porózus üvegre rétegezzük az adszorbenst,  
a vizsgálandó folyadék az oszlopon önként átszivárog,  
az áramlást vákuummal kell (lehet) elősegíteni.

### A kromatográfiás oszlopok töltése: száraz és nedves eljárással.

Száraz töltéskor az adszorbenst lassanként, rétegezve szórjuk az oszlopba, az oszlopot tömörítjük.

Nedves töltéskor az oszlopot félig megtöltjük oldószerrel, az adszorbenst ugyanezzel az oldószerrel feliszapolva töltjük az oszlopba.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az oszlopkromatográfia metodikája:

A kromatografálandó anyagokat tömény oldattá alakítjuk.

Ha az elválasztandó anyagokat az oszlop erősen adszorbeálja, hígabb oldatokkal is dolgozhatunk.

A szétválasztandó oldatot óvatosan öntve töltjük be az oszlopba (az adszorbenst ne keverjük föl).

Az oszlopnak nem szabad kiszáradnia.

## A kromatogram kifejlesztése:

Az oszlopon tiszta oldószert engedünk át.

A kifejlődést befolyásolja az oldószer átfolyási sebessége.

Az optimális szétválasztáshoz be kell állítani az oldószer átfolyásának megfelelő sebességet.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

**A színes anyagok** szétválasztásának figyelemmel kísérése a legegyszerűbb.

**A színtelen anyagok elválásának észlelése:**

Ibolyántúli fényben,

fluoreszkáló adszorbensek használatával,

a színtelen anyagok színes származékokká alakításával,

a kiválasztandó anyaghoz megközelítően azonosan adszorbeálódó színes indikátorokkal,

vizsgált anyag színreakcióba vitelével lehetséges.



## Megoszlási kromatográfia

Egymással nem elegyedő vagy csak korlátozottan elegyedő folyadékokban az anyagok, oldékonyságuktól függően, különböző mértékben oldódnak.

Alkalmas több összetevőből álló elegyek komponenseinek szétválasztására.

A megoszlást előidéző oldószerek egyikének szabad mozgását adszorpcióval megakadályozzuk, a másik oldószert áramoltatjuk át ezen az adszorbensen.

A rendszerben sorozatos megoszlási folyamatok játszódnak le.

Az elválasztandó elegy összetevői egyenként, különválva hagyják el a kromatografáló rendszert.



## A megoszlási kromatográfia elmélete

Az alkalmazott adszorbens a szilárd hordozó, a rajta megkötött folyadék az álló fázis, a másik oldószer a mozgó fázis.

Az elválasztandó elegy összetevői e két fázis között oszlanak meg.

A szilárd hordozó lehet oszlopba töltött porszerű adszorbens, szűrőpapírlap, vagy -csík.

Ez alapján lehet:

Megoszlási oszlopkromatográfia,  
papírkromatográfia.





## Ioncserés kromatográfia

Az álló fázis polimer szerkezetű szerves vagy szervetlen anyag, amelyen aktív csoportok vannak.

Az aktív csoportok a vázról leszakadni nem tudnak, ellenionok is tartoznak hozzájuk, amelyek a mozgó fázis hasonló jellegű ionjaival kicserélődhetnek.

A **kationcserélő polimer** aromás gyűrűhöz kötött disszociáló (protonleadó) csoportot tartalmaz:



A kicserélhető kation lehet  $\text{H}^+$  vagy  $\text{Na}^+$ .

**Az anioncserélő** anyagok disszociációra képes különböző rendű kationokat tartalmaznak, hozzájuk anionként  $\text{OH}^-$  és  $\text{Cl}^-$  is kapcsolódhat.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A folyékony mozgó fázisban oldott ionoknak az álló, szilárd fázis disszociációjára képes, funkciós csoportjairól származó ionokkal való reverzibilis kicserélődése:

**sztoichiometrikus,**

**a tömeghatás törvénye alapján játszódik le.**

Az ioncserélők az aktív helyek disszociációs foka szerint erősen savas, gyengén savas, erősen bázisos, és gyengén bázisos lehet.

Az ioncserélő kromatográfiában, **több oldott ion esetén**, az ioncserélő gyanta az egyik iont jobban megköti, mint a többi, a **folyamat szelektív** lehet.

Az egyensúly eléréséhez szükséges időtartam hosszabb az adszorpció kromatográfiánál.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A **többértékű ionok erősebben kötődnek** a gyantához.

Azonos töltetű ionok között a sorrendet a **hidratált ion átmérője** szabja meg.

Az elválasztást **befolyásolja a hőmérséklet**.

Az oszlopon megkötött ionokat eluálhatjuk:

Az eluáló oldat kicserélhető ionokat tartalmaz, amelyeknek affinitása az oszlopon lévő rögzített ionokhoz nagyobb, mint a megkötött anyagé.

A kötött ionok kicserélődési állandóik sorrendjében hagyják el az oszlopot.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Legelőnyösebb ha az ioncserélő gyanták egyféle aktív csoportot tartalmaznak.

A kationcserélő és anioncserélő műgyanták szilárd váza vinil-benzol, divinil-benzol kopolimer.

## Kapacitás:

A száraz ioncserélő egységnyi mennyisége hány mól oldott iont tud kicserélni.

Az egységnyi tömegű (g) műgyantára vonatkoztatott milligramm-ekvivalens.

## Az ioncserélő **gyanta duzzadása:**

A polárosabb oldószerek erősebb duzzadást okoznak.

A kevésbé poláros oldószerre való áttérés az oszlop összeesését, csatornaképződést, a polaritás növelése az oszlop eltömődését okozhatja.



## Az ioncserés oszlopkromatográfia metodikája

Az oszlop homogén méretű szemcsékből áll.

Az ioncserélő oszlopot nedves, iszapolós módszerrel töltjük.

A gyantát használat előtt az előírt oldószerben duzzasztjuk.

A kromatografálást vizes oldatban végezzük, elúciós, kiszorításos módszerekkel.

Az ioncserélő műgyanta regenerálása az aktív helyre bekötendő iont nagy koncentrációban tartalmazó oldat segítségével.

A kationcserélő műgyantákat savas oldatokkal (ritkábban  $\text{Na}^+$ -ionokkal), az anioncserélőket többnyire lúggal vagy kloridionokkal regeneráljuk.

Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfias meghatározása a későbbiekben részletesen tárgyalásra kerül.



## Gélkromatográfia

Különböző méretű molekulák analitikai és preparatív szétválasztására.

A különböző méretű komponensekből álló elegyet granulált és duzzasztott gélszemcsékből álló rendszerre visszük.

Az eltérő méretű komponensek különböző sebességgel haladnak keresztül, elkülönülten hagyják el a rendszert.

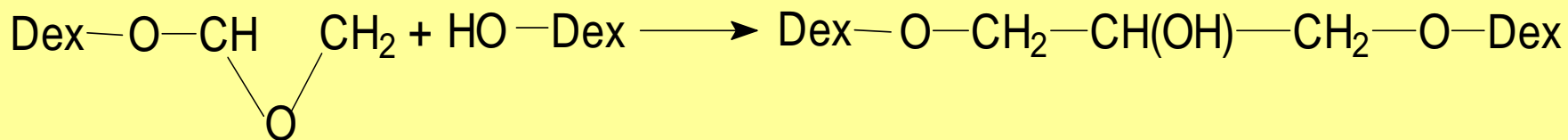
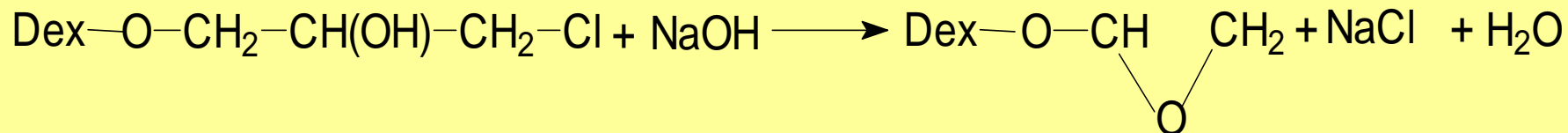
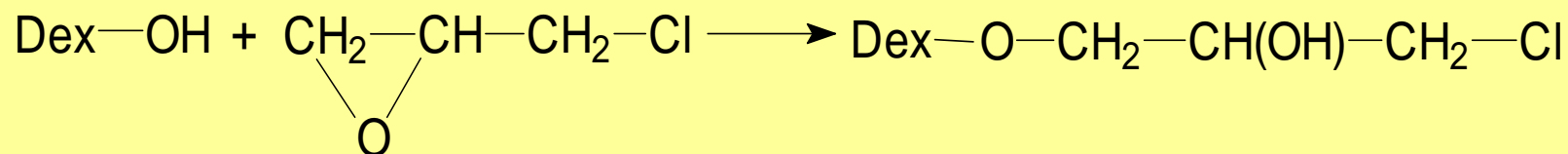
A kisebb méretű molekulák behatolnak a gélszemcsék pórusaiba, áthaladásuk a diffúzió miatt lassú.

A nagyobb molekulák a szemcsék közötti mikrojáratokon keresztül gyorsabban átjutnak a rendszeren, a pórusokba nem tudnak behatolni.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A dextrángél kialakulása



Dex-OH = dextrans,  
CH<sub>2</sub>-(O)CH-CH<sub>2</sub>-Cl = epiklórhidrin

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Fontos tulajdonságok:

A szemcsék közelítsék meg a gömb alakot, duzzadt állapotban se legyenek túl lágyak.

A dextrángélek kiindulási anyaga egy oldható poliszacharid, a dextrán.

Kizárólag glükózrészekből épül fel.

A glükózrészek között 90%  $\alpha$ -1,6-glikozidos, 10%  $\alpha$ -1,3-glikozidos kötést lehet találni.

Az alkalikus dextránoldat epiklórhidrin hatására teljes tömegében, hőfejlődés közben hidrogéllé merevedik.

A glükózláncokat glicerinéter-hidak kapcsolják össze.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## **A térháló pórusainak nagysága függ:**

a kiindulási dextrán molekulatömegétől, koncentrációjától,  
az epiklórhidrin arányától.

Szintetikus gélképző anyagok is használatosak a gélkromatográfiában.

A gélképző anyagok megfelelő oldószerrel elegyítve szétválasztásra alkalmas gélkromatográfiás oszloppá duzzaszthatók.

## **A gél jellemző tulajdonsága:**

A részecskék közötti folyadék térfogata.

A duzzadt gélszemcsék belsejében lévő oldószer térfogata.

A gélképző anyag saját térfogata.

## **Géloszlop kromatográfia**

A gélkromatográfiát kromatografáló oszlopon valósíthatjuk meg.

A duzzasztott géanyagot a megfelelő oldószerrel átmossuk.

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Oldószer folyamatos felvitele vagy szivattyúval vagy az oldószertartály megfelelő magasba helyezésével.

Szükséges összekötő csővezeték, az eluátum gyűjtéséhez frakciószedő berendezés.

Detektor → a vizsgált oldat jellemző tulajdonságát automatikusan méri és regisztrálja.

## Gélréteg-kromatográfia

Csak különlegesen finom szemcsézettségű Sephadex-készítmények használhatók.

A 0,5 mm vastagságú gélrétegek bizonyultak a leghasználatóbbnak.

A kromatografálás alatt a réteg nem száradhat ki.

Gondoskodni kell:

A futtatószer be- és kivezetéséről,

a réteg megfelelő dőlésszögének kialakításáról.

A réteg-gélkromatográfia aminosavak és fehérjék szétválasztására terjedt el.



## A gélkromatográfia alkalmazása

### Gélszűrés:

A gélrendszerre anyagok elegyét visszük fel.

Az egyik komponens kis molekulákból, másik komponens rendkívül nagy molekulákból áll.

A nagy molekulák a szemcsék közötti térben gyorsan haladnak át a gélágyon.

Alkalmas kolloidok sótanítására, molekulacsoportok molekulatömeg szerinti szétválasztására.

### Kromatográfias szétválasztás:

A szétválasztandó elegy komponenseinek molekulái között csak csekély különbség van.

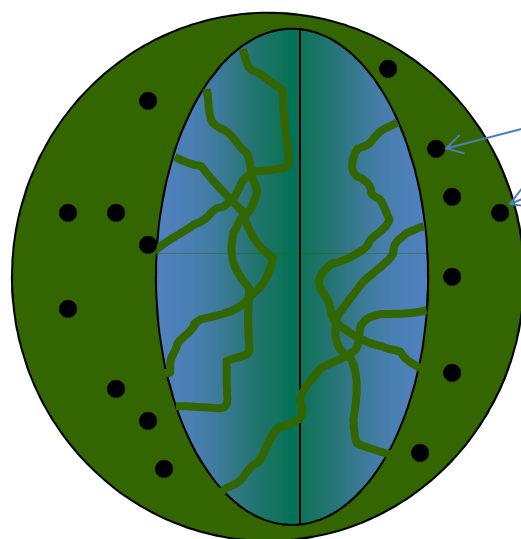
Az elválasztás annál sikeresebb lesz, minél hosszabb az oszlop.

Alkalmas pl. a nagyobb molekulatömegű zsírsavak trigliceridjeinek szétválasztása.



## Gél vagy méretkizárásos folyadékkromatográfia I.

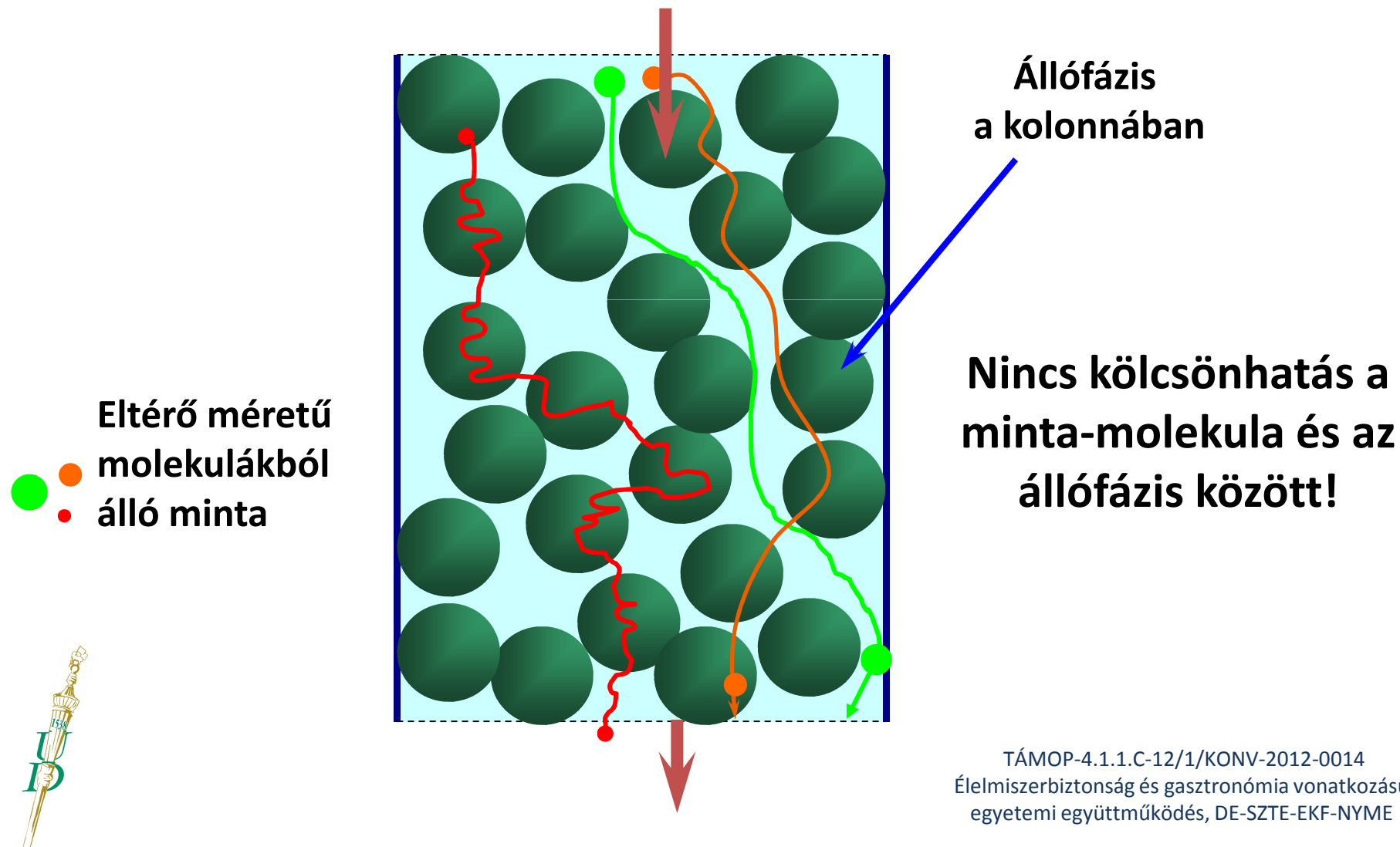
Gél szemcse



Pórusok átmérője > 10 nm)



## Gél vagy méretkizárásos folyadékkromatográfia II.

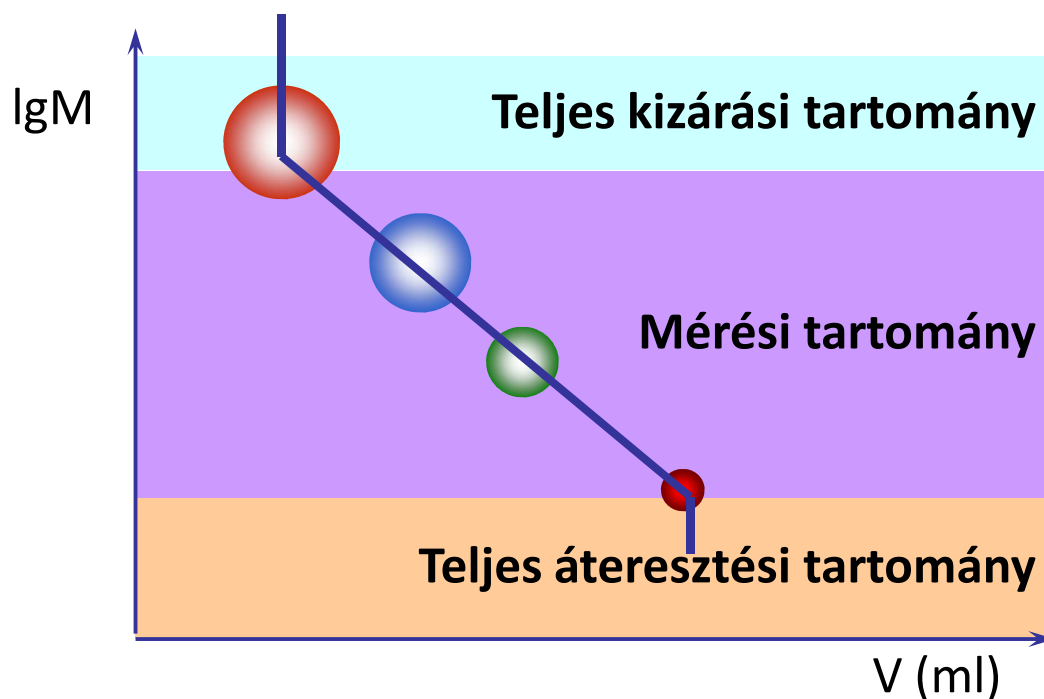


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Teljes kizárási tartomány az a nagyobb molekulaméret, amelynél nincs visszatartás (holt térfogat).

Mérési (működési) tartomány az a molekulaméret, amelynél van visszatartás.

Teljes áteresztési tartomány a nagyon kis molekulák, amelyek teljesen átjárják a pórusokat (a retenciós idő konstans).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Molekulatömeg-meghatározás:

A duzzadt géloszlopok pórusain keresztül az azonos molekulatömegű (méretű) anyagok hasonló módon haladnak keresztül.

Ha az ismeretlen anyag ismert molekulatömegű komponenssel azonos módon halad át az oszlopon, következtetést vonhatunk le az ismeretlen anyag molekulatömegére vonatkozóan.

Szükség van ismert molekulatömegű anyagokra.

Természetes, mesterséges azonosító anyagokat alkalmazunk.



## Affinitás folyadékkromatográfia

Biológiailag aktív molekulák elválasztására fejlesztették ki kb. 30 éve (forradalmasította a molekuláris biológiát, biokémiát, biotechnológiát).

Olyan más vizsgálatok, alkalmazások kifejlesztéséhez vezetett, amelyek alapja a molekuláris, illetve biofelismerés.

Affinitás kromatográfia alapja: az oszlopon megkötött biomolekula szelektíven felismer és reverzibilisen megköt más biomolekulát.

A megkötött molekulákat eluáljuk az oszlopról a mérési körülmények megváltoztatásával (pl. ionerősség, pH, oldószer, hőmérséklet).





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Alkalmazások:

Immunaффinitás kromatográfiával az oszlopon megkötött antitestekkel (antibodies) antigéneket tisztítunk.

Receptorok, enzimek, DNS fragmensek izolálására.

Ellenanyaggal tisztíthatjuk azt a vegyületet, amely az ellenanyagot termelte.

Immobilizált antitestekkel toxinokat kötnek meg vérből (hemoperfúzió).

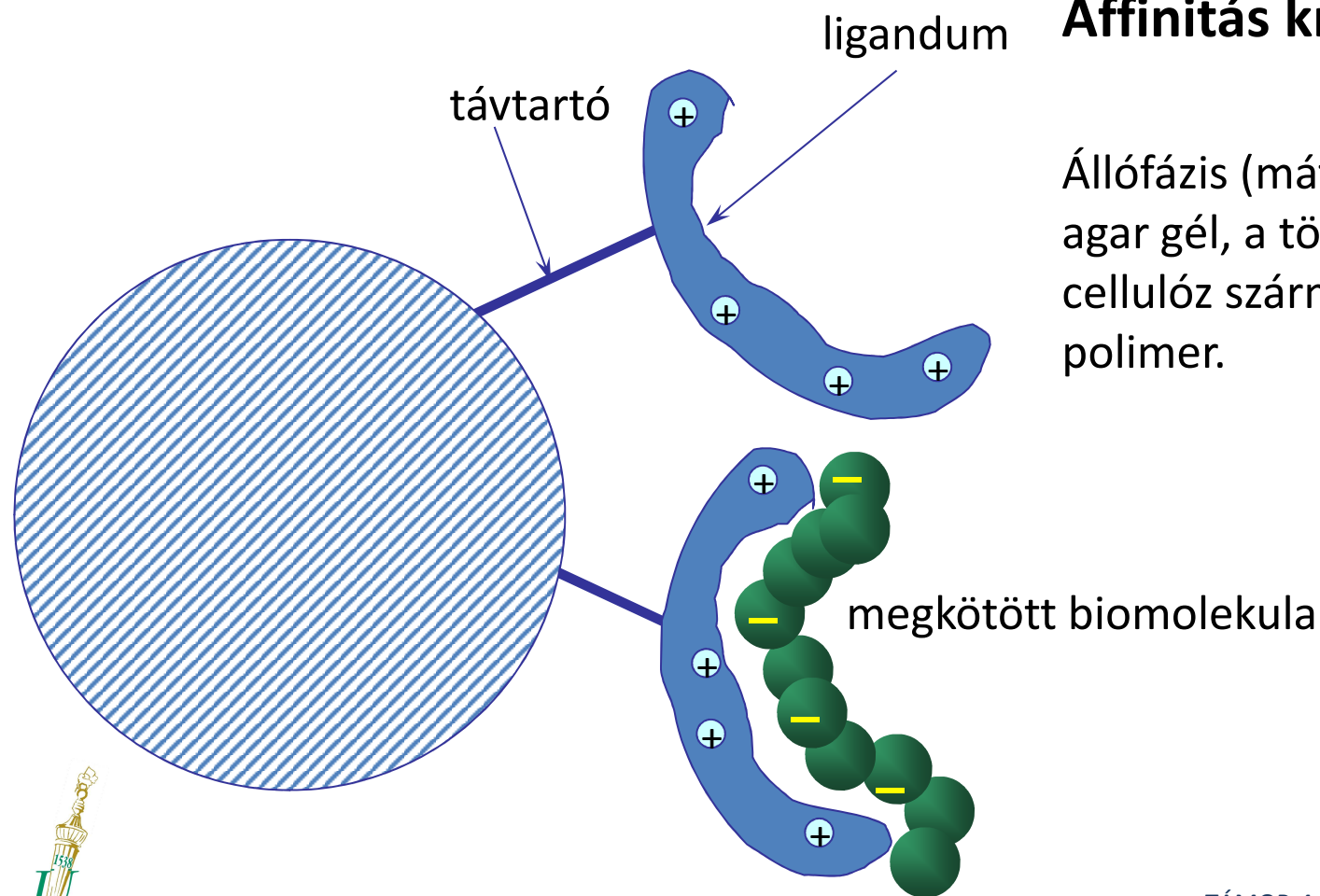
Szilárd fázisú immunoassay alkalmazásokban.

Az ipar biotechnológiai alkalmazásokban monoklonális antitestek ipari méretekben történő gyártására.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Affinitás kromatográfia



Állófázis (mátrix) 90%-ban agar-agar gél, a többi Sephadex gél, cellulóz származékok vagy egyéb polimer.



## Nagyhatékonyságú (nagynyomású) folyadékkromatográfia (HPLC)

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia automatizált, nagynyomású kromatográfiás eljárás.

A mozgó fázis folyadék.

A gyakorlatban használt töltet:

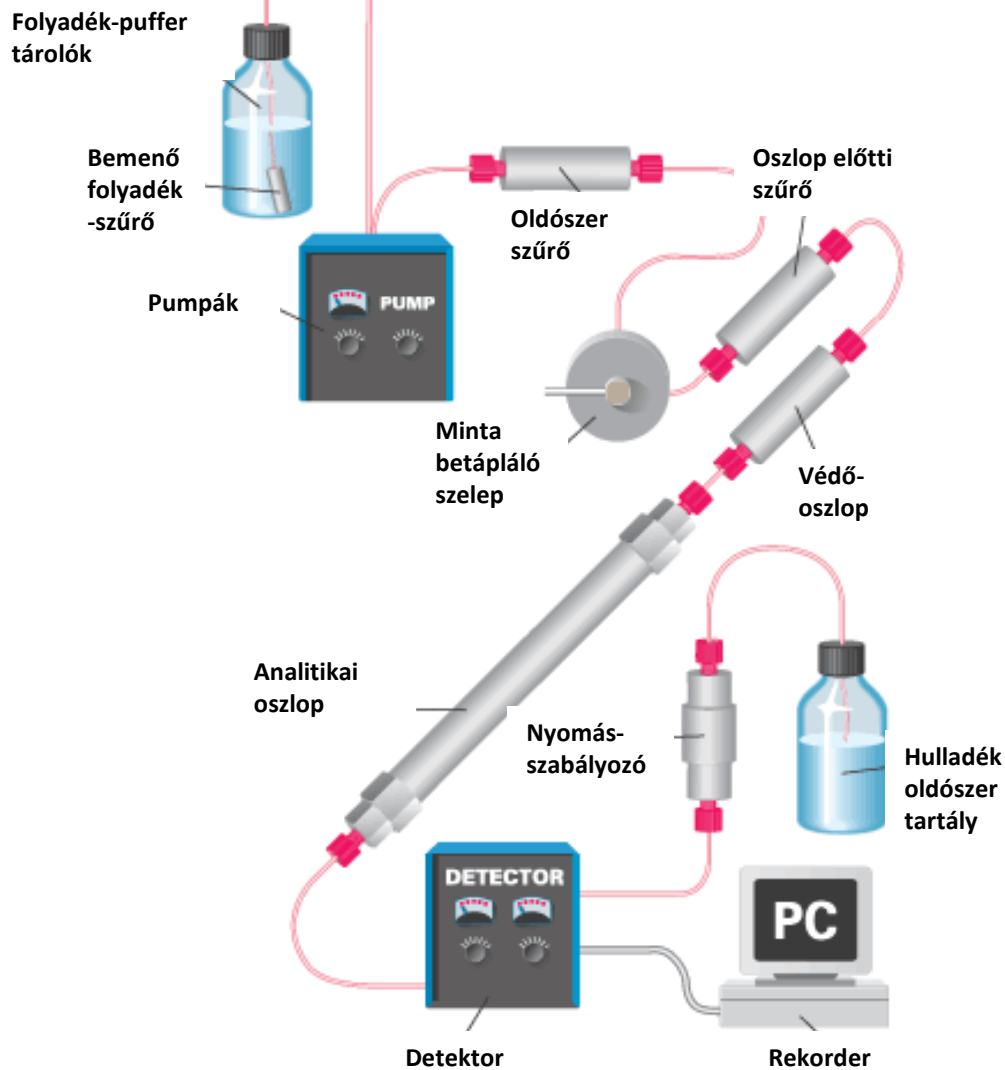
Nagyfokú keresztkötésekkel készített polimerek (sztírol-divinilbenzol kopolimerek, polimetakrilátok),

szilikagél alapú mikroszemcsék vagy kemény gélek.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Egy folyadék-kromatográf felépítése



## A nagyhatékonyságú folyadékkromatográf felépítése

### Puffertárolók

Az oszlopra felvitt minta komponenseire bontása eluálóoldat folyamatos, nyomás alatti bevezetésével történik.

Az eluensek gáztalanítását a tartály légterének ritkításával és az eluensek kiforralásával oldják meg.

Szükségessé válhat, hogy az eluens polaritását, pH-ját, illetve ionerősségét folyamatosan változtassuk.

A hatást két vagy több egymással elegyedő, de eltérő tulajdonságú oldószer összekeverésével lehet elérni.

Az analízis során az eluens összetételét előzetesen meghatározott program szerint változtatják, **gradienselúció**.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Szivattyúrendszer

A töltet nagy hidrodinamikai ellenállású → 1–35 MPa (10–350 bar) nyomásra van szükség (újabb készülékek 50–70 MPa-on is dolgoznak).

### Az optimális szivattyú:

Pulzálásmentesen szállít,  
lehetővé teszi a gradienselúcióhoz szükséges gyors folyadékcserét,  
minimálisak a belső holtterek.

### A HPLC-szivattyú lehet:

Alternáló dugattyús szivattyú, pulzáló áramlást hoznak létre,  
membrán szivattyú, pulzáló folyadékáramot hoznak létre,  
injekciós rendszerű szivattyúk, löktetésmentesen áramoltatnak,  
pneumatikus szivattyú, gáznyomással működő.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## **Eluens szállító egység – Pumpa**

**Izokratikus** – az eluens összetétele az elválasztás során konstans.

**Gradiens** – eluens összetétele az elválasztás során, előre megállapított függvény szerint változik.

## **Elvárások:**

0,01-10,0 ml/perc áramlási sebességgel „pulzálás mentesen” tudja szállítani az eluenst akár 300-400 bar nyomásesés mellett is.

Korrózió tűrő (pl. kénsav, salétromsav).

Könnyen légteleníthető.

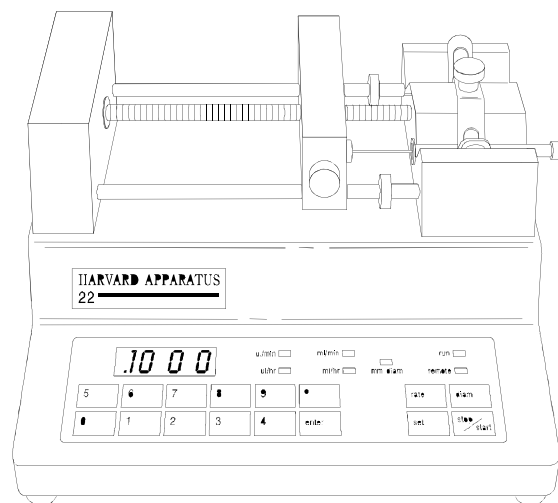
Programozható.

Számítógép vezérelhető.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Infúzió „Syringe” pumpa



Áramlás  $<20 \mu\text{L}/\text{min}$  (általában  
 $1 - 2 \mu\text{L}/\text{min}$ )

MS detektor

Fecskendő pumpa

**Előnye:**

Pulzálás mentes.

Egyszerű szerkezet;

**Hátránya:**

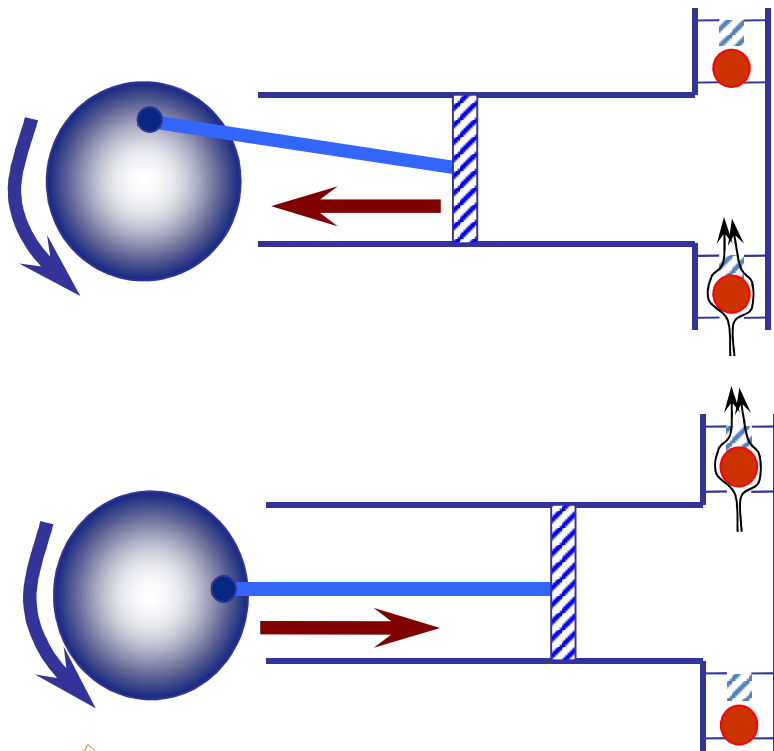
Újrafeltöltést igényel.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Alternáló mozgást végző, dugattyús pumpák



TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

**Alternáló mozgást végző, dugattyús pumpák.**

**Előnye:**

Folyamatos, megbízható működés.

Egyszerű szerkezet.

**Hátránya:**

Pulzálás.

Pulzálás csillapítás:

Pulzálást csillapító flexibilis membránnal.



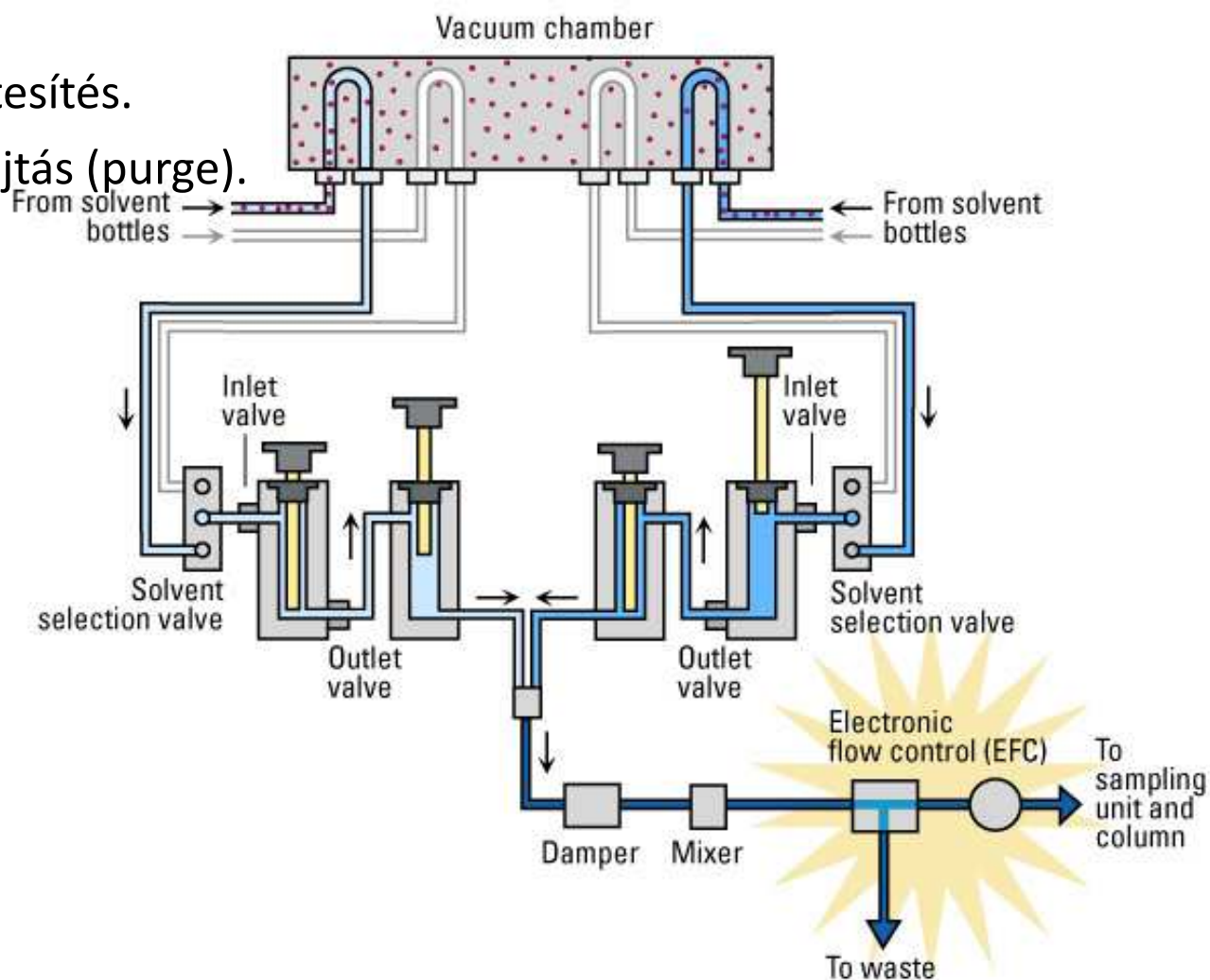
# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Gázmentesítés

Vákuummal történő légmentesítés.

He gázzal történő levegőkihajtás (purge).

Ultrahang fürdővel.



## Mintaadagolók

Injektálás: A minta „dugószerű” bejuttatása a folyadék áramba = injektálás.

Injektálási technikák:

Manuális (kézi)

Parciális hurok (loop) feltöltés mikrofecskendővel.

Teljes loop injektálás.

Automata

Parciális.

Teljes loop injektálás.

Fecskendő injektálás.

Mintabemérő mikroszelep:

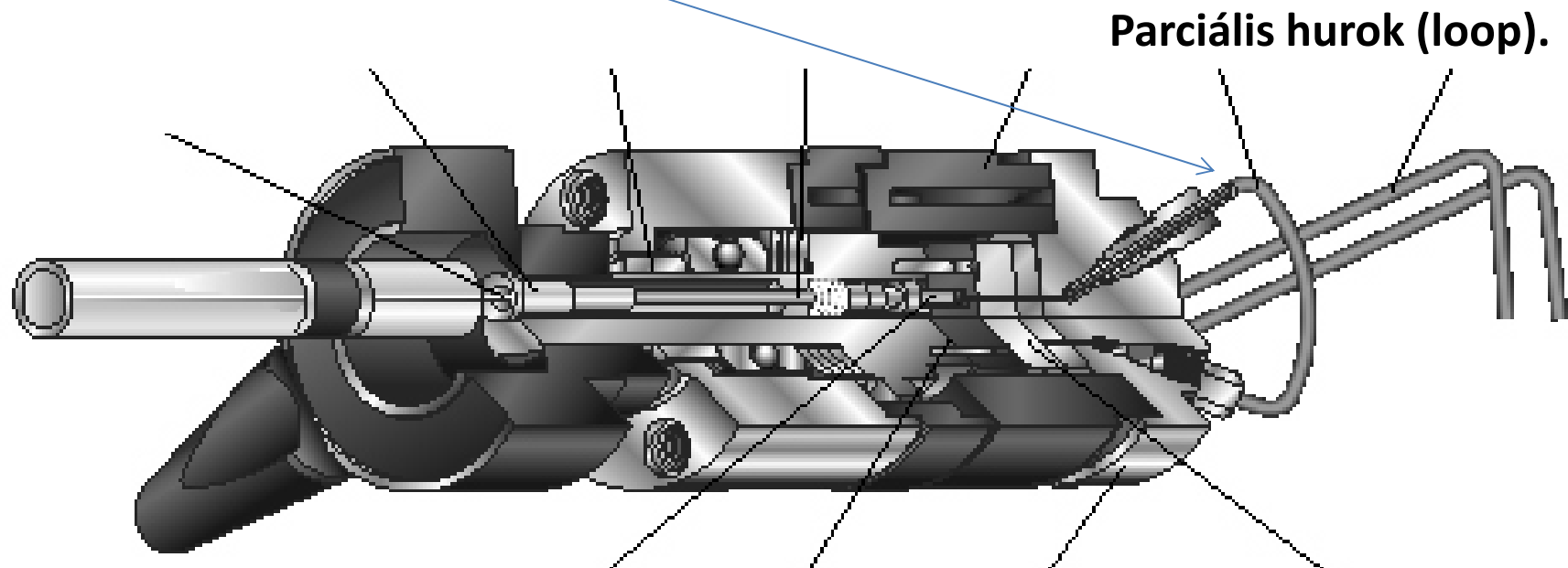
A mintát fecskendővel juttatjuk a szelep külső csőspirálisába.

Egy határozott mozdulattal beforgatjuk a feltöltött csőszakaszt az eluensáramba.



## Manuális injektálás

Parciális hurok (loop) feltöltés mikro-fecskendő segítségével.



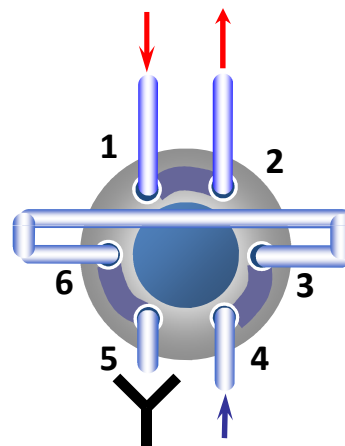
# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Manuális injektálás:

Fix térfogatú (2 µl-500 µl) minták injektálására.



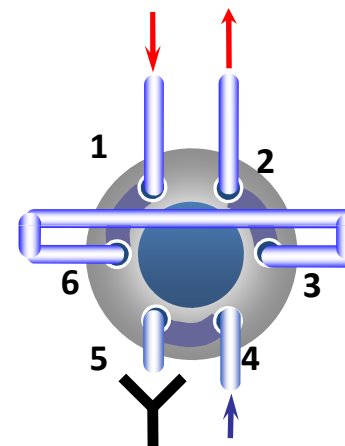
pumpa      oszlopra



feltöltés

„LOAD”

pumpa      oszlopra



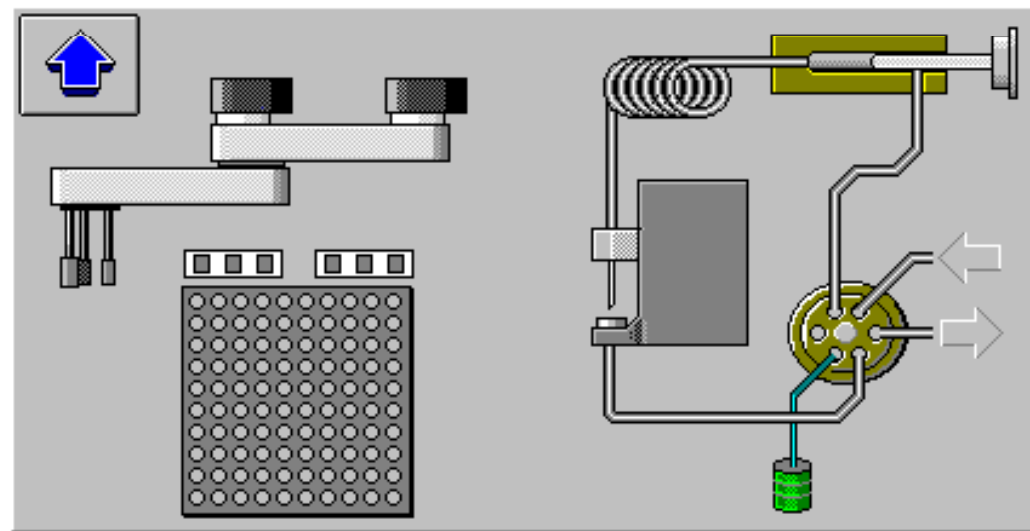
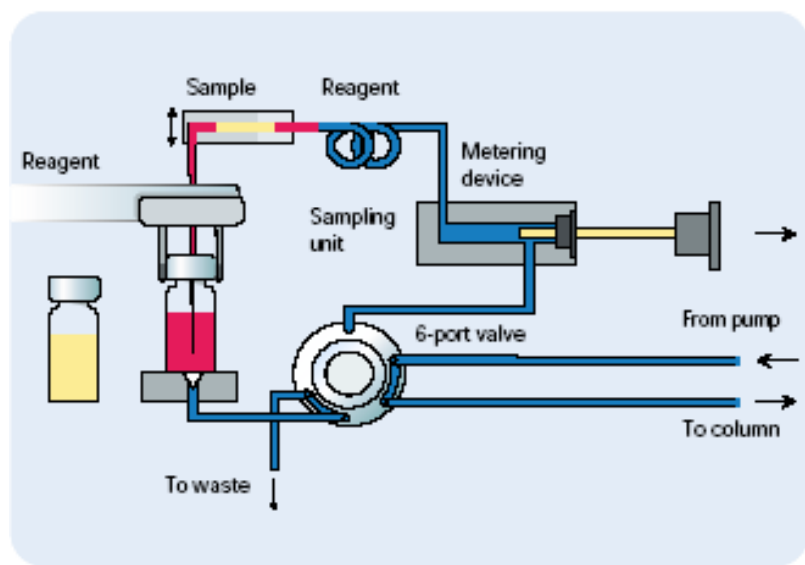
„INJECT”

Különféle térfogatú hurkok



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Automata injektálás



## Elvárások az automata injektorokkal szemben:

Állítható paraméterek (injektálási térfogat, minta felszívási sebesség, mosási ciklus száma és/vagy sebessége).

Minimális átszennyezés ( $<0,1\%$ ).

Injektálási pontosság (max. 1-2% RSD).

Szükség esetén hűthető legyen a mintatálca (biológiai minták, aminosavak, fehérjék).

Mintatároló rész fénytől védhető legyen (fényérzékeny anyagok).

Programozható legyen (pl. származékképzés).

Számítógép vezérelhető.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Oszlopok

Nyomásálló, rozsdamentes acélból készülnek.

Hosszuk 15–50 cm, belső átmérő 2,5–4,0 mm.

Leggyakoribb a 25 cm x 4 mm-es méret.

Porózus felületű gyöngyökkel vagy porózus réteggel bevont gyöngyökkel valósítható meg a legnagyobb hatékonyság.

## Az oszlop töltése

### Száraz töltési módszer:

40  $\mu\text{m}$ -nél nagyobb átmérőjű gömb alakú és 20  $\mu\text{m}$ -nél nagyobb átmérőjű porózus felületű szemcsék esetén.

### Tömési eljárással:

Az adagokat teflon végű dugattyúval tömör töltetté nyomják össze.

**Zagy formájában:** nagynyomású folyadék segítségével.

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Különböző HPLC oszlopok és csatlakozások I.



TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Különböző HPLC oszlopok és csatlakozások II.

**Preparatív oszlop, 40-100 mm i.d.**



**Félpreparatív oszlop 20 mm i.d.**



**Félpreparatív oszlop 8 mm i.d.**



**Analitikai oszlopok 3,0; 4 vagy 4,6 mm i.d.**



**Mikro(bore)oszlopok 1 vagy 2 mm i.d.**



**Gyors oszlopok 2,0- 4,6 mm i.d.**



## Folyadékkromatográfiás detektorok

### Detektor típusok:

**A komponensek tulajdonságát észlelik, a vegyület fizikai tulajdonságát detektálják:**

UV- látható abszorbancia detektor (UV- VIS).

Fluoreszcenciás detektor (FLD).

Elektrokémiai detektor (ECD).

Radiokémiai detektor (RD).

Tömeg detektorok (MSD).

Nitrogén detektor (NSD).

**Előnyök:** specifikusság, érzékenység, szelektivitás.

**Hátrányok:** minden vegyület más (pl. más  $UV_{max}$ ).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Különböző HPLC oszlopok és csatlakozások II.

**Mozgófázis tulajdonságát észlelik,** mozgófázis fizikai tulajdonságában történő változást detektálják.

Törésmutató detektor (RID).

Vezetőképeség detektor (CD).

Fényszórásos detektor (LSD).

**Előnyök :** nagyon sok komponensre – majdnem univerzális.

**Hátrányok:** zaj, érzékenység.



## Általában a detektorokról

Kimutatási határ (LOD - limit of detection).

3:1 jel/zaj arány tiszta referencia anyaggal.

Mérési alsóhatár (LLOQ - lower limit of quantitation).

Mátrixban validált legkisebb kalibrációs pont.

Mérési felsőhatár (ULOQ - upper limit of quantitation).

Mátrixban validált legnagyobb kalibrációs pont.

Dinamikus tartomány (koncentráció változás-jel változást idéz elő).

Lineáris tartomány (egységnyi koncentráció változás-állandó jel változást idéz elő).

Szelektivitás.

Érzékenység.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A detektorral az oszlopot elhagyó eluensben az elválasztott komponensek koncentrációja folyamatosan követhető.

## A detektor zaja:

Adódhat a műszer elektronikájából,  
a hőmérséklet és a hálózati feszültség ingadozásából,  
az áramlássebesség-változásból,  
a szivattyú pulzálásából.

Ismerni kell a detektor-alapvonal eltolódását.

A nagynyomású folyadékkromatográfok általában **UV-VIS fotométer, fluorométer, differenciál-refraktométer detektorral** működnek.



## Az UV-VIS tartományban működő fotométerek:

### UV detektor

A vegyületek UV energiát nyelnek el, amelynek hullámhossza a vegyületben lévő  $\pi$  kötések (konjugációk) mennyiségétől függ.

Viszonylag érzéketlenek az áramlási sebesség változására, a hőmérséklet-ingadozásra. Ezért több vegyület érzékeny detektálását teszik lehetővé.

A mintáknak az ultraibolya vagy látható tartományban abszorbeálniuk kell.

A deutérium lámpa fénye résen keresztül a monokromátorházba jut, homorú tükör optikai rácstra vetíti.

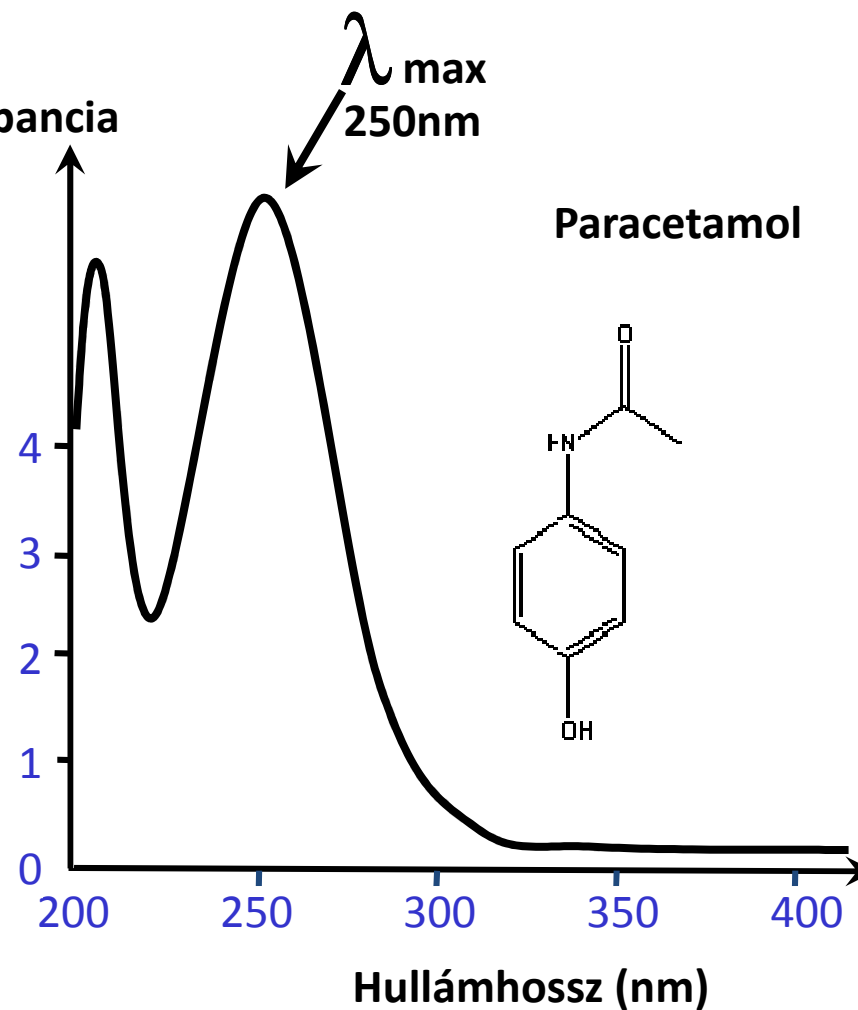
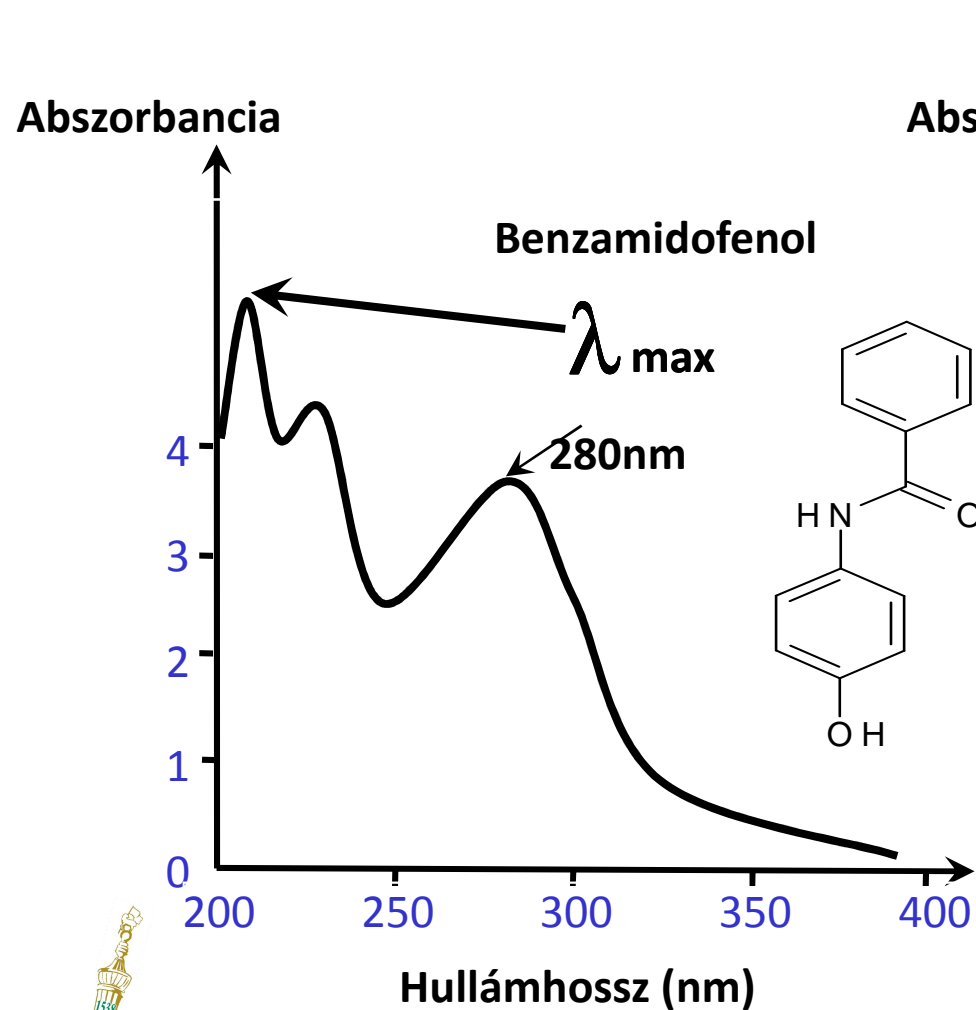
A kívánt hullámhosszú monokromatikus fény kiválasztható.





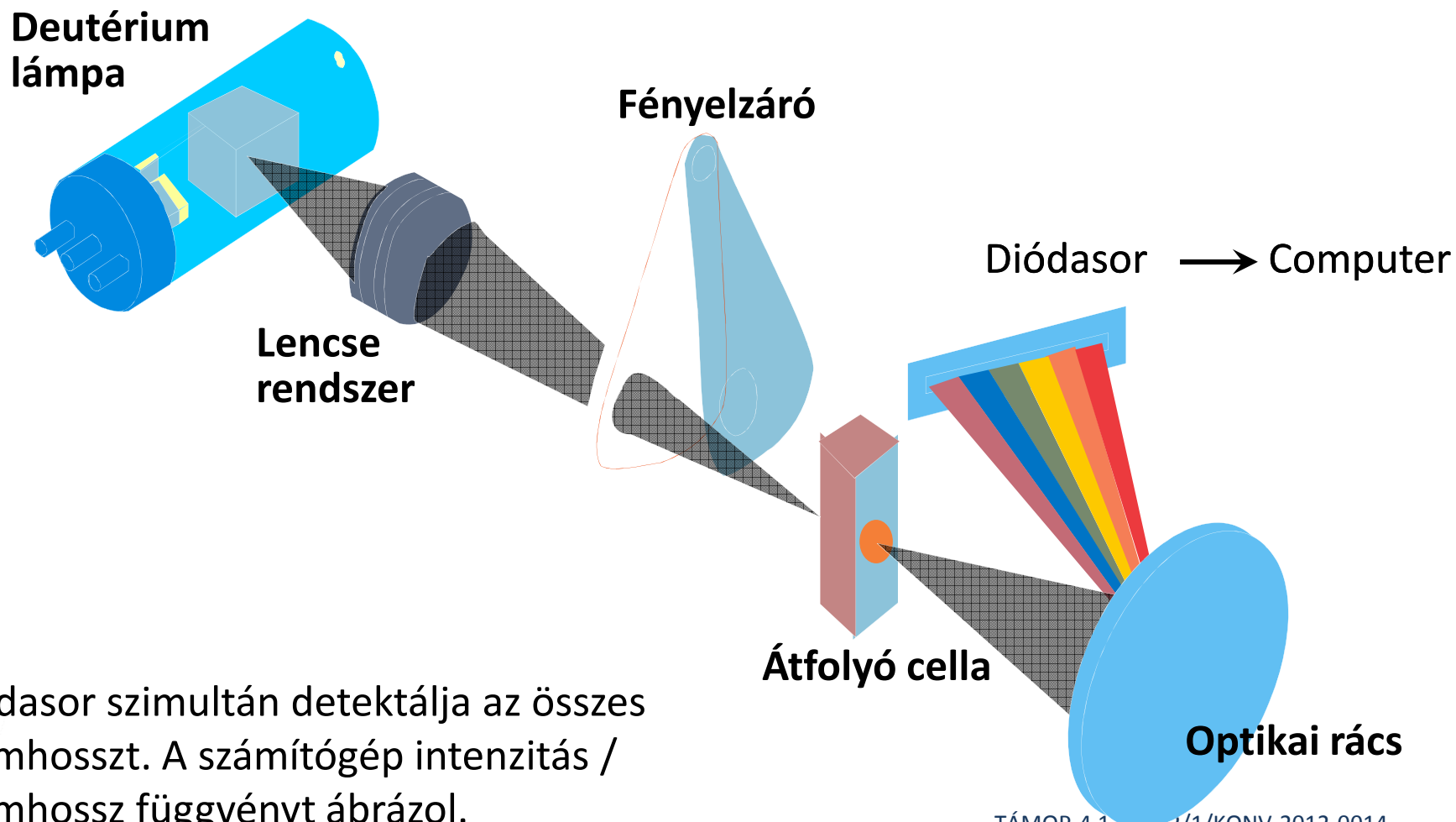
# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A benzamidofenol és a paracetamol UV spektruma



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Diódasoros detektor



A diódasor szimultán detektálja az összes hullámhosszt. A számítógép intenzitás / hullámhossz függvényt ábrázol.

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Differenciálrefraktométerek:

Az érzékelő folyamatosan méri a referenciacellában lévő tiszta és az analizátorcellában lévő, az elválasztott komponenst is tartalmazó eluens törésmutatója közötti különbséget.

## Fluorometriás detektorok:

Az elválasztott komponensek ultraibolya sugárzással keltett fluoreszcens sugárzását mérik.

Nem fluoreszkáló vegyületből származékképzéssel fluoreszcenciára képes vegyület készíthető (pl. aminosavak).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Érzékenyebb, szelektívebb, mint az UV-VIS detektor.  
Csak fluoreszkáló komponensek detektálására alkalmas.

## **Emittált fény intenzitását befolyásoló tényezők:**

- Gerjesztési forrás intenzitása.
- Besugárzott minta térfogata (cella térfogat).
- A mérendő komponens koncentrációja.

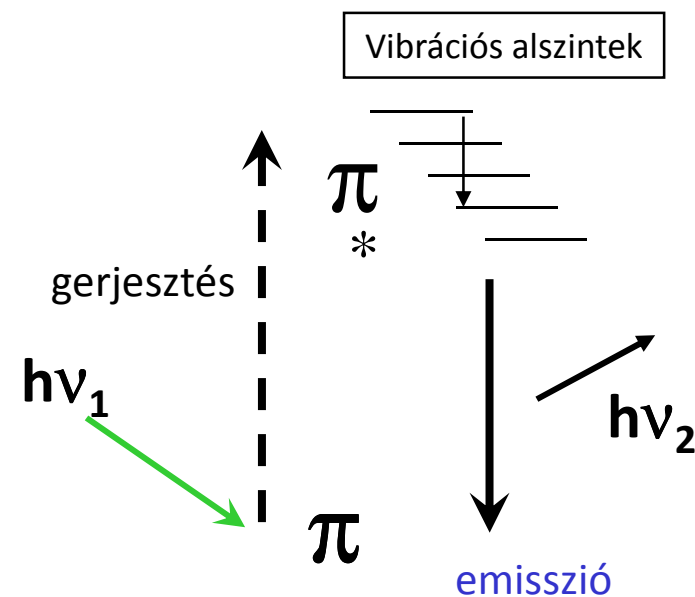
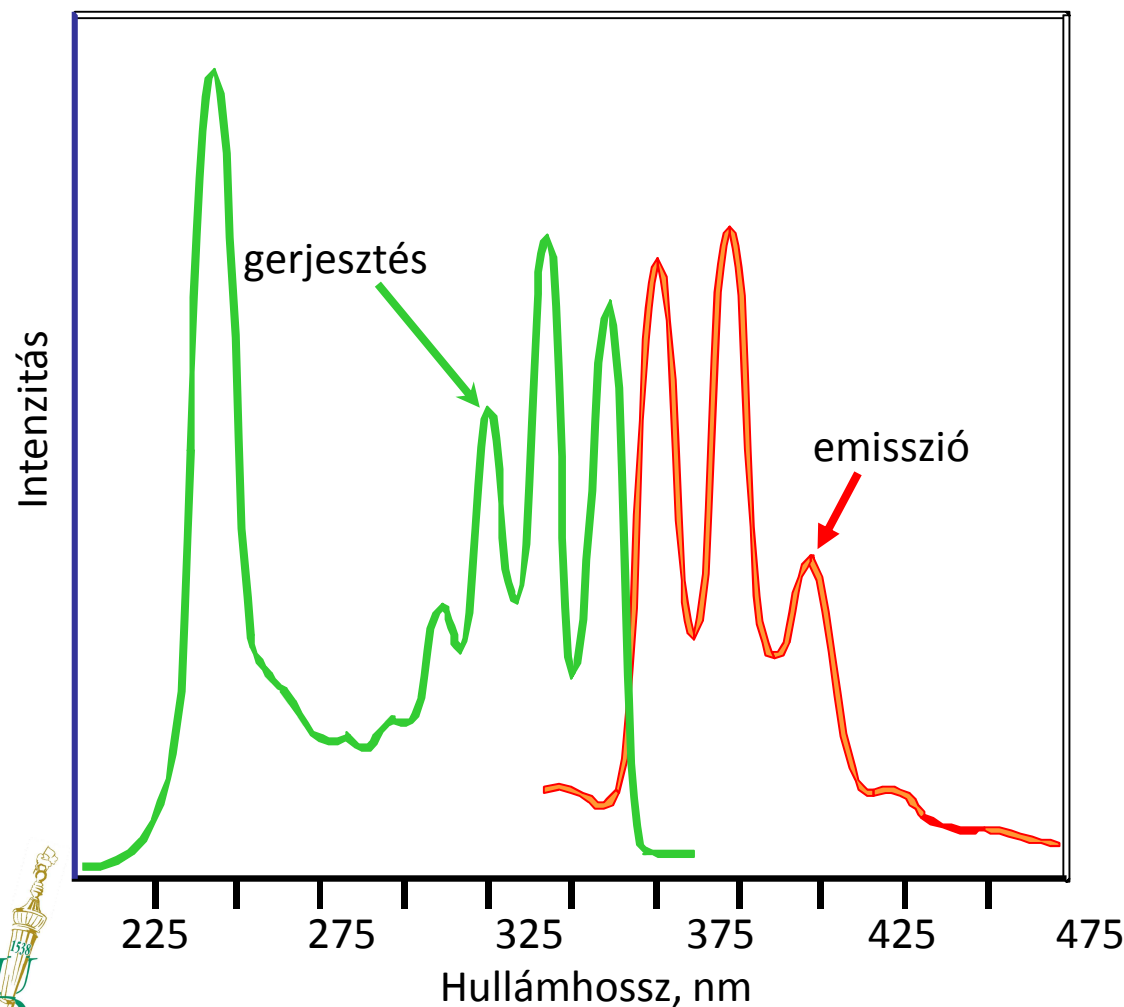
## **Fluoreszcenciát csökkentő tényezők:**

- Oldott oxigén vagy más szennyező anyag.
- A szórt fény megnöveli a zajt (nagy molekulák, más fényvisszaverő felület).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az antracén gerjesztési és emissziós spektruma metanolban



## A kromatogramok értékelése

A kromatogram egy diagram, melynél az idő függvényében olvasható le a minta koncentrációjával arányos detektorjel.

Ideális esetben minden komponens szimmetrikus haranggörbe vagy Gauss-görbe alakkal jellemző csúcs formájában lép ki az oszlopból.

Minden csúcs a komponens anyagi minőségének jellemzésére alkalmas, meghatározott idő eltelte után hagyja el az oszlopot.

A minta injektálása és az oszlop végén, a csúcsmaximum megjelenése között eltelt időt retenciós időnek nevezzük ( $t_R$ ).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

**Jellemző a szomszédos csúcsok retenciós idejének különbsége.**

Minél nagyobb ez a különbség, annál könnyebben választható el a két komponens.

Minden komponensre jellemző a sávszélesség.

Minél kisebb a sávszélesség, annál keskenyebbek a csúcsok, annál jobb az elválasztás.

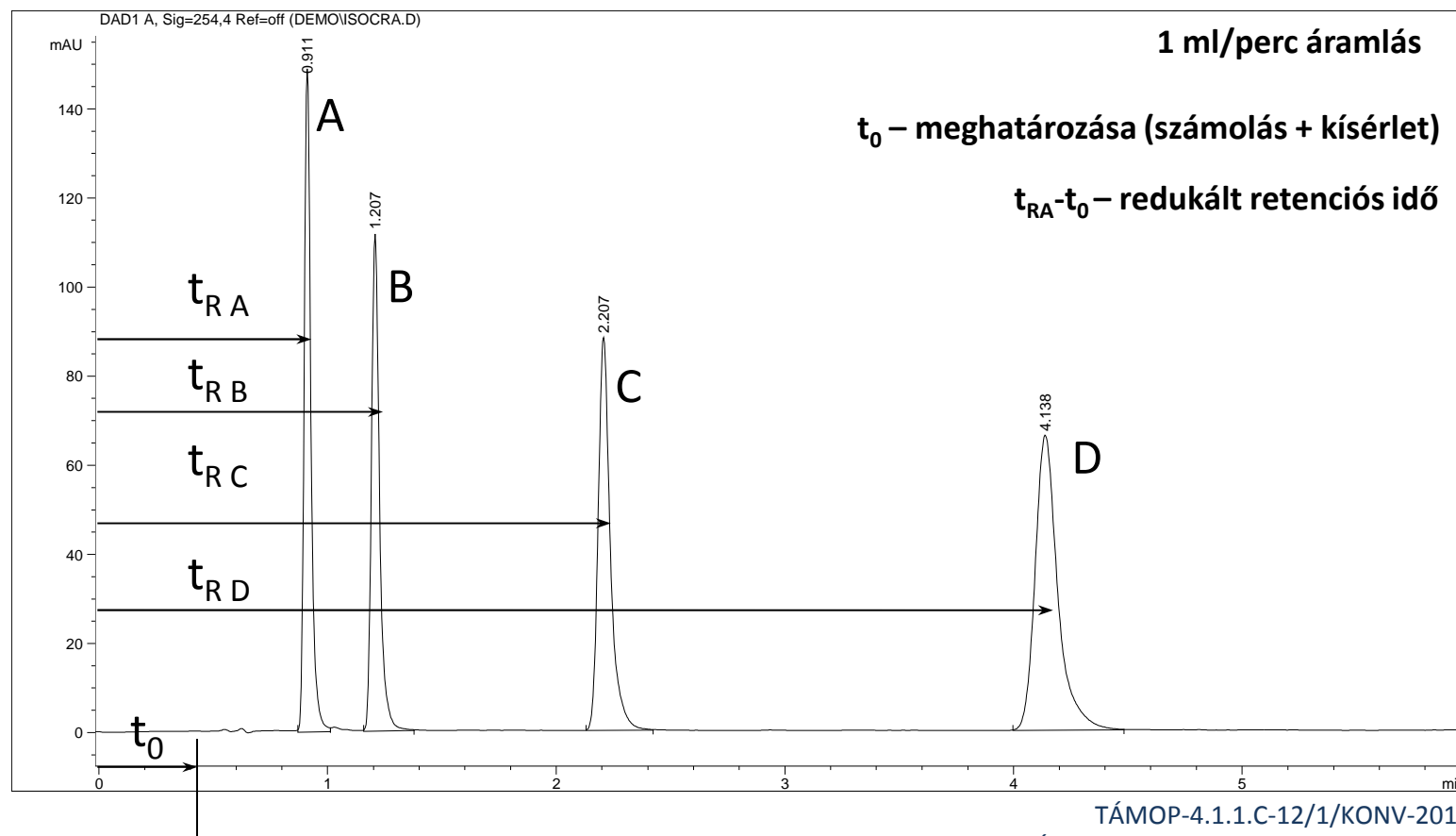
**Mennyiségi értékelés a csúcsmagasság, illetve a csúcsterület mérésével lehetséges.**

Csúcsmagasság mérése: csúcsmagasságnak az alapvonaltól a csúcs legmagasabb pontjáig terjedő távolságot tekintjük.

Csúcsterület mérése: a csúcs magassága szorozva a csúcs félmagasságánál mért szélességgel

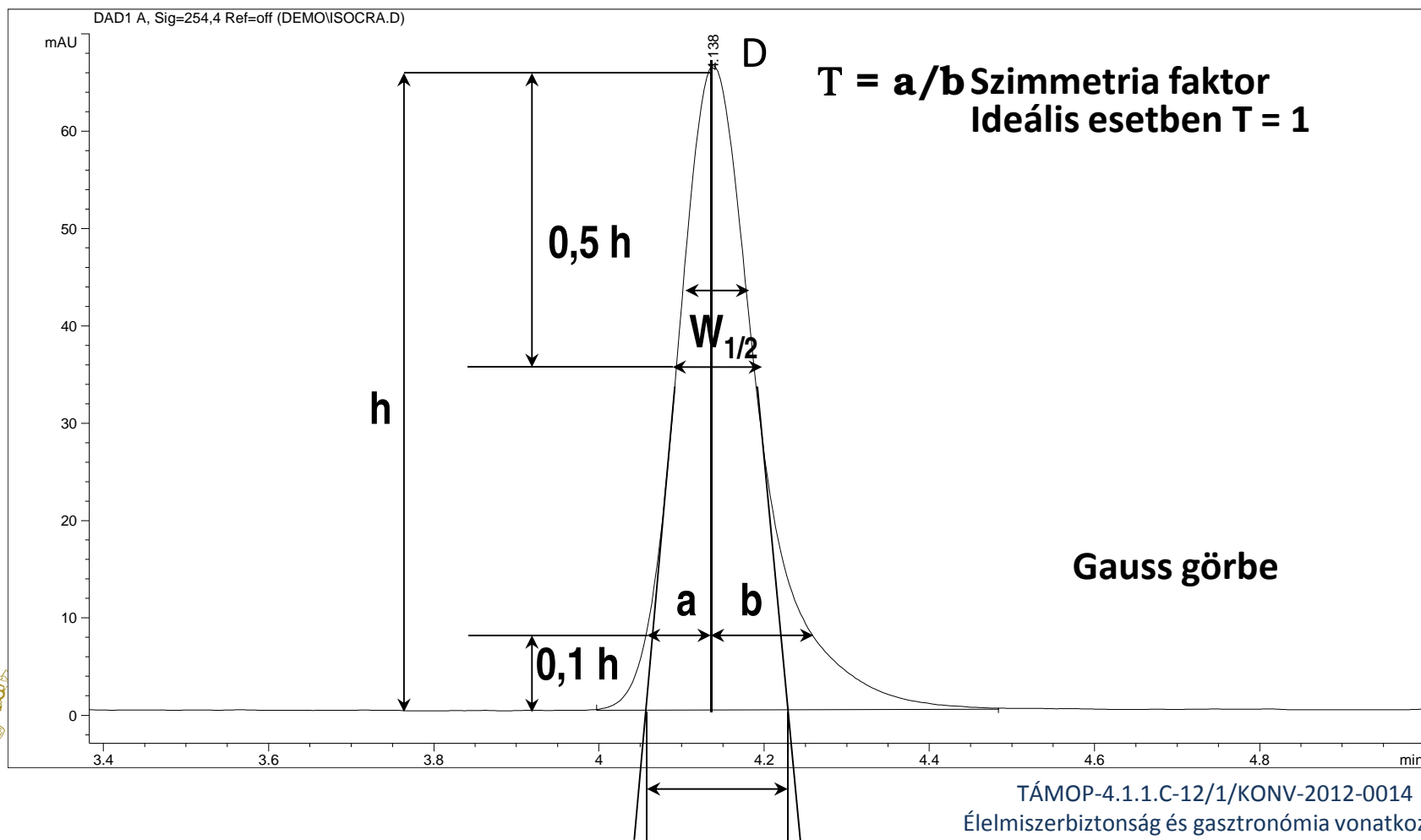


## A retenciós idő alakulása az elválasztás során

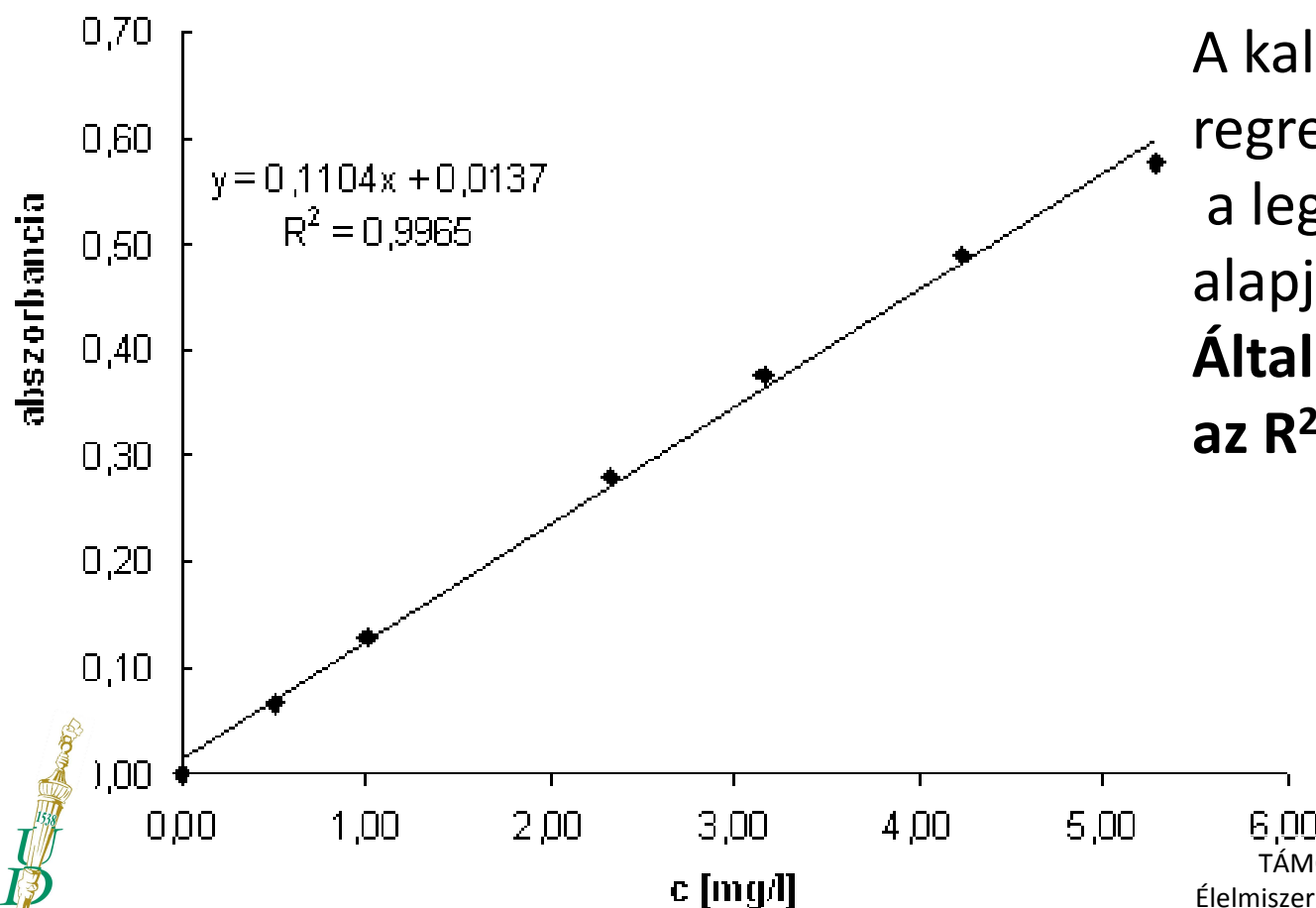




## A szimmetria faktor definíciója



## Kalibráló egyenes szerkesztése



A kalibrálás egyenesét regressziós egyenessel, a legkisebb négyzetek alapján számítjuk.  
**Általános elvárás, hogy az  $R^2 > 0,98$  legyen.**



# A folyadékkromatográfia alkalmazása élelmiszerek összetételének meghatározására



## A fehérjék oszlopkromatográfiája

A kromatográfia szorpción és deszorpción alapuló elválasztástechnikai módszer.

Az eljárás lényege, hogy az elválasztandó anyagok egy keskeny kezdeti zónáról különféle szorbenseken, folyadék- vagy gázáramlás hatására, eltérő sebességgel mozdulnak el.

A fehérjeanalitikában és a preparatív elválasztás-technikában az oszlopkromatográfia kiemelkedő jelentőségű.

Segítségével hasonló szerkezetű frakciók választhatók el egymástól.

Preparatív oszlopkromatográfiával egy-egy anyag igen nagy tisztaságban izolálható.

Fehérjék szétválasztására és meghatározására mind a folyadék-szilárd, mind folyadék-folyadék kromatográfia elterjedt.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A módszerek az elválasztást előidéző hatások alapján adszorpció, megoszlásos és ioncserés elválasztásokra oszthatók.

Követelmények:

- Az állófázis oldhatatlan legyen a mozgófázisban,
- az állófázis irreverzibilisen ne kösse meg az elválasztandó anyagokat,
- ne bontsa el azokat és ne lépjen reakcióba a mozgófázis komponenseivel.

Az eljárás során az oszlopon az elválasztandó anyagok különböző erővel kötődnek, majd a mozgófázis áramoltatásával a kötődésük erősségétől függően deszorbeálódnak.

Ez a folyamat folytatódik az oszlop teljes hosszában, melynek során jelentős eltolódások jönnek létre a szétválasztani kívánt komponensek között.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az elválasztandó komponensek különböző időpontban elkülönülve jelennek meg az oszlop végén.

Az eluált anyagot a fehérjeanalitikában általában UV-abszorpcióval határozzák meg (fenilalanin, tirozin, triptofán).

Az UV-abszorpció időbeni változását ábrázolva kapjuk a kromatogramot, melynek segítségével az egyes komponensek azonosíthatók és mennyiségileg meghatározhatók.



## A fehérjék vizsgálata adszorpciós oszlopkromatográfiával

Az adszorpciós kromatográfiában alkalmazott szorbensek közül csak kevés alkalmazható fehérjék elválasztására.

Ennek oka, hogy kapacitásuk nagy molekulájú anyagokkal szemben viszonylag kicsi, a fehérjék csak kis hatásfokkal választhatók el ezzel a módszerrel.

Az ilyen típusú kromatográfiás körülmények között a fehérjék denaturálódhatnak és biológiai aktivitásukat is elveszíthetik.

A fehérjeanalitikában adszorbensnek alkalmazták az alumínium-oxidot, a cellulózt, a kaolint és a szilikagélt, azonban ezek jelentősége a gyakorlatban minimális.



## A fehérjék vizsgálata megoszlásos oszlopkromatográfiával

Az elválasztás alapja az elválasztandó anyag ismételt ellenáramú megoszlása egy álló- és egy mozgófázis között.

- Az állófázis egy szemcsés hordozóra felvitt nagy viszkozitású folyadék.
- A mozgófázis vizes oldatok és szerves oldószerek különböző összetételű elegye.

A fázisok közötti egyensúlyi koncentráció-megoszlás elsősorban a mozgófázis polaritásától függ.

A megoszlásos oszlopkromatográfia a fehérjekutatásban nem tudott igazán nagy jelentőségre szert tenni.

Ez azokkal a bonyolult viszonyokkal magyarázható, melyek az álló- és mozgófázis, valamint a fehérjék kölcsönhatása következtében kialakulnak.





## A fehérjék vizsgálata ioncserés oszlopkromatográfiával

Az ioncserélő oszlopkromatográfia álló fázisa egy olyan ioncserélő anyag, amelynek mátrixához elektrolitos disszociációra képes csoportok kötődnek kovalens kötéssel.

Azokat az ioncserélőket, amelyek mátrixán a fix ion negatív töltésű savmaradék, kationcserélőknek, a pozitív töltésű fix iont tartalmazókat pedig anioncserélőknek nevezzük.

A fix ionok ellenionjai ugyanolyan töltésű más ionokkal kicserélhetők.

Az ioncserés kromatografálás során:

- a szorbens ellenionjait először az oszlopra adagolt minta ionjai váltják fel,
- ezeket, töltéseik nagyságával ellenkező sorrendben, az eluáló pufferoldat ionjai fokozatosan kicserélik.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A kicserélés, ill. elválasztás függ a kromatografálás hőmérsékletétől, valamint a mozgófázis ionkoncentrációjától és a pH-tól.

A nagy molekulatömegű fehérjék esetén a töltést nem csak az őket alkotó aminosavak aránya határozza meg, jelentősen befolyásolja azt az oldószer pH-ja is.

- Az izoelektromos pontnál kisebb pH-jú oldatban a fehérjemolekulák pozitív,
- nagyobb pH-jú oldatban pedig negatív töltésűek lesznek.
- A pozitív töltésű anyagok szorpciójához kationcserélő, a negatív töltésűekéhez pedig anioncserélő szorbenst kell alkalmazni.

Fehérjék oszlopkromatográfiás elválasztásához ioncserélő műgyantákat, cellulózalapú ioncserélőket vagy ioncserélő-géleket alkalmaznak.



## Elválasztás ioncserélő műgyantákon

A fehérjék ioncserés oszlopkromatográfiás vizsgálatakor ügyelni kell arra, hogy:

- a nagy molekulatömegű anyagok könnyen denaturálódhatnak,
- mások az ioncserélő gyanta funkciós csoportjaira irreverzibilisen kötődhetnek.

Az optimális ioncserélő kiválasztásához ismerni kell:

- az elválasztandó anyagok izoelektromos pontját,
- biológiailag aktív anyagok esetében azt a pH-tartományt, amelyben stabilitásukat nem veszítik el.

A fehérjeanalitikában leggyakrabban divinil-benzollal különféle mértékben térhálósított szulfonált polisztirol, valamint polimetakrilsav műgyantákat használnak.



## Elválasztás cellulóزالapú ioncserélőkkel

Igen jó hatásfokkal használhatók fehérjék és peptidek elválasztására az erősen hidrofil, cellulóزالapú ioncserélők és gél ioncserélők.

Aktív csoportjai a cellulóz felületén helyezkednek el, de ezek mellett a cellulóz hidroxilcsoportjai is megkötik a bonyolult szerkezetű fehérjéket.

Az ioncserélő cellulózszármazékok a cellulóz rostos szerkezete és a cellulózmolekula hidroxilcsoportjai miatt nagy mennyiségű vizet tudnak felvenni.

A száraz ioncserélő cellulóz előkészítése:

- A cellulóz hidratálása.
- Az első eluáló pufferrel történő szuszpendálást követően a kromatografáló oszlopba való töltése.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A szétválasztás menete:

- A szétválasztani kívánt fehérjeoldatot az oszlop felett lévő puffer alá rétegezzük, vagy pedig az oszlop feletti puffer leengedése után az oszlop felszínére engedhetjük.
- A növekvő pH-jú és ionkoncentrációjú pufferekkel, gradienselúcióval választjuk szét a frakciókat.
- Miután a fehérjefrakciók elhagyták az ioncserélő oszlopot, az oszlop töltetét 1 M NaOH-dal regeneráljuk.
- A lúgot az oszlopról desztillált vízzel kimossuk.
- A következő elválasztás előtt az első puffer oldatával addig mossuk, amíg az oszlopról távozó pufferoldat pH-ja azonos nem lesz az eredeti pufferével.

Az ioncserélő cellulóz és a pufferek összetételének változtatásával szinte valamennyi jelenleg ismert fehérje izolálása, a többi fehérjefrakciótól történő elválasztása és meghatározása megvalósítható.



## A fehérjék vizsgálata egyéb kromatográfiás módszerekkel

### Affinitás kromatográfia:

Az állófázis olyan szorbens, amelynek oldhatatlan mátrixához kovalens kötésre képes gyök segítségével egy biológiailag aktív vegyület van kötve.

Ez a bioszorbens-molekula a mozgófázisból származó biológiailag aktív vegyülettel reakcióba tud lépni.

A bioszorbens által létrehozott reakció lehet egy reverzibilis kötés, vagy lehet egy olyan kémiai folyamat, amelynek során a mozgófázisban lévő molekula kémiailag átalakul.

Ily módon enzimeket lehet a szilárd hordozóhoz kapcsolni, és az immobilizált enzimeket fel lehet használni fehérjék szétválasztására és meghatározására.



## **Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia:**

Kiválóan alkalmas fehérjekomponensek szétválasztására és meghatározására.

A mozgófázis áramoltatása rendkívül nagy nyomáson történik.

Így nő a hatékonyság, és felgyorsulnak az elválasztási folyamatok.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia további előnye az automatizálhatóság, melynek következtében a szubjektív hiba gyakorlatilag csak a minta-előkészítésre korlátozódik.



## A fehérjék gélkromatográfiája

A gélkromatográfia a molekulatömeg-különbségeken alapuló, egyik legelterjedtebb elválasztási módszer.

A gélkromatográfiás elválasztás során a mozgó fázis valamilyen folyadék, a töltet pedig finom eloszlású gél, megfelelő pórusmérettel.

A gél belsejébe csak azok a molekulák tudnak behatolni, amelyek mérete a gél pórusméreténél kisebb.

Amely molekulák behatolnak a gél szemcsék belsejébe, azok tovább maradnak az oszlopon, nagyobb oldószertérfogattal eluálódnak.

Mivel **egy gél pórusai mindig inhomogének**, a gélkromatográfia során **a gél pórusainál kisebb és nagyobb molekulatömegű tartományba tartozó fehérje-molekulák egymástól elválaszthatók.**





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Legfőbb alkalmazási területei:

Gyors molekulatömeg-mérés,  
preparatív csoportszeparálások a molekulatömeg alapján,  
az egyes csoportok preparatív frakcionálása,  
a peptidek, valamint a fehérjék gélkromatográfiás tisztítása.

**Aminosavak is szétválaszthatók gélkromatográfiával,** azonban e módszer pontossága, illetve hatékonysága meg sem közelíti az ioncserés oszlopkromatográfiás vagy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározását.



## A fehérjék rétegekromatográfiája

A kromatográfiás módszerek közül a rétegekromatográfia a planáris módszerek csoportjába tartozik.

Az oszlopkromatográfia felbontóképessége jelentősen nagyobb, mint a rétegekromatográfiáé.

A rétegekromatográfiának számos előnye van az oszlopkromatográfiával szemben.

- A rétegekromatográfiával elválasztott vegyületek vizuálisan értékelhetők, a szétválasztott vegyületek kimutatására szelektív és specifikus színreakciók alkalmazhatók.
- Oszlopkromatográfiás elválasztáskor egyes komponensek értékelhetetlenül, irreverzibilisen az oszlophoz kötődnek.
- A rétegekromatográfiában a kromatográfiás feltételek megváltoztatása rövid időt vesz igénybe.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A rétegekromatográfiás analízis során a hordozók megválasztásával lehetőség van megoszlási, adszorpciós és ioncserés rétegekromatográfiás vizsgálatokra is.

- A **papírkromatográfia** manapság már háttérbe szorult.
- Elterjedtek a 0,25–0,50 mm vastag **kent rétegek**, melyeket megfelelő aktiválás után lehet analitikai célokra felhasználni.
- Kaphatóak **kész réteglapok**, amelyek készítéséhez hordozólapnak üveglemezt és műanyag- vagy alumíniumfóliát használnak.
- A kész réteglapok könnyen tárolhatók, darabolhatók, egyszerűen dokumentálhatók és egyenletes, homogén réteget adnak.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A vizsgálandó oldott anyagmintákat cseppenthetjük pontban vagy sávban.

A felcseppentés után a réteglapokat csiszolt fedelű futtatókádba állítjuk, melynek az aljára töltjük a futtatószer-elegyet.

Az oldószerelegy megfelelő távolságra jutása után a réteglapot a kádból kiemeljük.

A megszáradt rétegen a szétválasztott anyagokat saját színük, UV fluoreszcenciájuk vagy megfelelő reagenssel való bepermetezés után, esetleg melegítéssel kombinálva, mutatjuk ki.



## A rétegekromatográfia alkalmazása élelmiszerfehérjék vizsgálatára

Az ioncserélő vékonyrétegen történő elválasztás az aminosavak és a peptidek szétválasztására használható.

A fehérjék elválasztására a gélréteg-kromatográfia a legalkalmasabb.

A gélréteg készítésére általában a dextránalapú félszintetikus és az akrilamidalapú szintetikus géleket használjuk.

- A gélrétegeket általában üveglapokon 0,5 mm vastagságban, rétegkenő szerkezettel készítik.
- A kent rétegek 15–20 perces szabad levegőn történő állás után felhasználhatók kromatográfiai vizsgálatokhoz.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az elválasztás menete:

A vizsgálandó fehérjemintából 1–5  $\mu$ l-t viszünk a gélrétegre.

Célszerű, ha a vizsgálati minta mellett ismert fehérjepreparátumot is futtatunk.

A gélréteg-kromatográfiás futtatókamra egy olyan berendezés, amely az üveglap 10–20 fokos dőlésével biztosítja az anyagok optimális vándorlási sebességét.

A futtatókeverék megegyezik a gélkromatográfiás elválasztásokhoz használt pufferrendszerekkel.

A futtatás után a gélréteglapot a futtatókamrából kiemeljük, majd elvégezzük a lapok értékelését.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A gélréteg-kromatográfia alkalmazási területei

Peptidek és fehérjék molekulatömegének meghatározása:

A fehérjék molekulatömegének logaritmus és egy adott rétegen, azonos idő alatt megtett távolság között szoros összefüggés van.

Biológiai folyadékok fehérjeösszetételének meghatározása.

Patológiás fehérjék detektálása.

A fehérjék elválasztására eredményesen használható a vékony gélrétegben végzett izoelektromos fókuszálás.



## A fehérje aminosav-összetételének meghatározása

A táplálkozással foglalkozó szakemberek számára fontos a fehérje aminosav-összetételének ismerete.

Az ember az esszenciális aminosavakat nem tudja előállítani, a nem fehérje nitrogén hasznosítására pedig gyakorlatilag nem képes.

Optimális összetételű élelmiszerek előállítása csak az élelmiszer esszenciális, illetve a limitáló aminosavai ismeretében lehetséges.

Az élelmiszerek aminosav-összetétele ismeretében biztosítani lehet az optimális fehérje és energiaellátást.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Élelmiszerek aminosav-összetételét a fehérje hidrolízise után határozhatjuk meg.

## Mérési lehetőségek:

az **ioncserés oszlopkromatográfia** elvén működő automatikus aminosav-analizátorral, oszlop utáni származékképzéssel,

a **folyadékkromatográfia** elvén működő nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, oszlop előtti származékképzéssel,

**fotometriásan.**



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az ioncserés oszlopkromatográfia (IEC), és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) a kromatográfias elválasztások közé tartozik.

Az IEC a folyékony-szilárd, a HPLC a folyékony-folyékony oszlopkromatográfias módszer.

Követelmények:

- Az álló fázis oldhatatlan legyen a mozgó fázisban,
- a szorbens irreverzibilisen ne kösse meg az elválasztandó anyagokat,
- ne bontsa el irreverzibilisen azokat,
- ne lépjen reakcióba az eluáló oldattal.

A kromatográfia mindegyik típusa tulajdonképpen az oldószer (mozgó fázis) haladási irányában az oszlopon keresztül egymás után bekövetkező szorpciós és deszorpciós folyamatok sorozata.



## Az aminosav-összetétel meghatározása IEC-vel

Az állófázis ioncserélő anyag, vázán kovalens kötéssel, elektrolitos disszociációra képes savas vagy bázisos jellegű aktív csoportok vannak.

- Ha az aktív csoport negatív töltésű savmaradék, kationcserélő,
- ha pozitív töltésű ion, akkor anioncserélő gyantáról beszélünk.

Az ioncserés elválasztást meghatározza:

- a kromatografálás hőmérséklete,
- az eluálóoldat ionkoncentrációja és pH-ja.

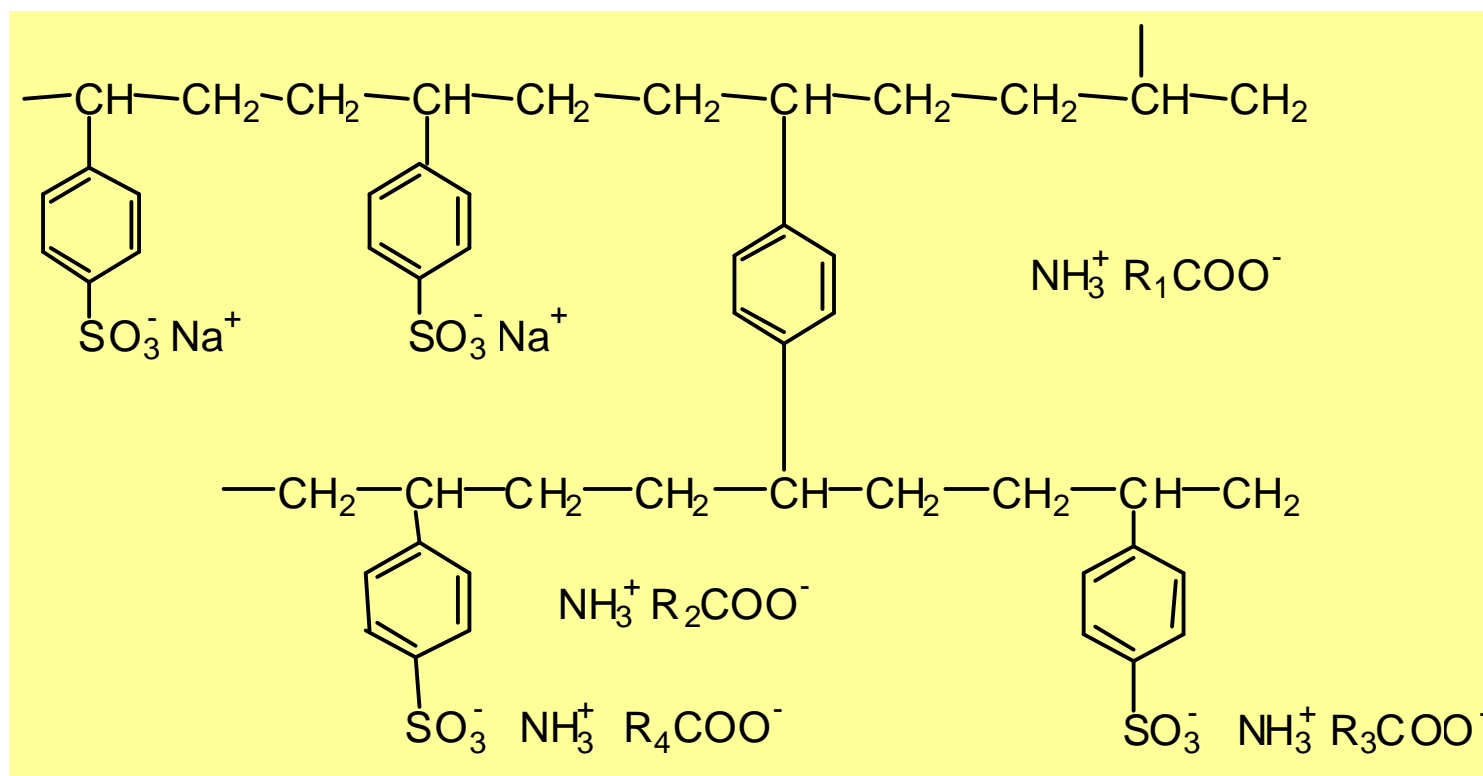
Az aminosavak (amfoter jellegüknek köszönhetően) savas körülmények között pozitív ionok.

Szétválasztásuk **Na-formában lévő, divinil-benzollal 4–8%-ban térhálósított szulfonált polisztirol műgyantán** végezhető el.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az ioncsere mechanizmusa



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az **aminosavak különböző erőkkel kötődnek** az ioncserélő oszlop negatív töltésű szulfonsav csoportjaihoz.

Az ioncserélőn kötődött aminosav-molekulák szorpciója és elúciója folyamán különböző intenzitással jut érvényre:

- Az aminosavak sajátos töltése,
- pK-ja,
- molekulatömege,
- oldalláncának poláros vagy apoláros volta.

Ezen tulajdonságok együttes következménye az aminosavak **deszorpciós sorrendje**.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az aminosavak deszorpciós sorrendjét befolyásolja még a **hőmérséklet, az eluáló pufferek pH-ja, valamint kationkoncentrációja.**

A kromatográfia pontosságát meghatározza **az ioncserélő műgyanta összetétele** is.

Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiájához divinil-benzollal különféle mértékben térhálósított **szulfonált polisztirol műgyantát** használnak.

Aktív csoportjai, a szulfonsavak, lehetnek hidrogén, **nátrium vagy lítium formában.**

## Az analízis menete:

A vizsgálati anyag előkészítése,  
a minta hidrolízise, a hidrolizátum feldolgozása,  
az aminosavak szétválasztása IEC-vel,  
az aminosavak mennyiségi meghatározása fotometrián,  
az eredmény számolása, értékelése.

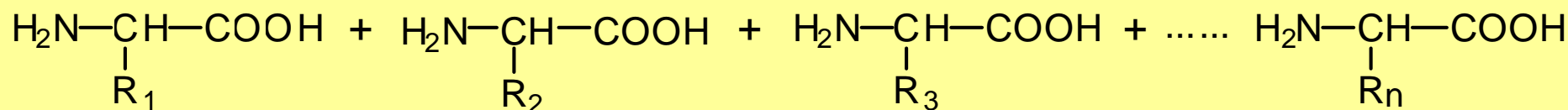
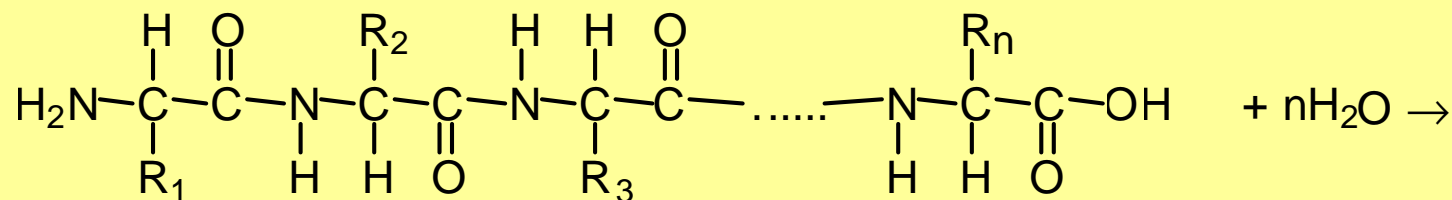


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A minta hidrolízise, a hidrolizátum előkészítése analízisre

A fehérjék aminosav-összetételének megállapításához a polipeptidláncot alkotó aminosavakat a kötéseikből fel kell szabadítani.

A polipeptidlánc hidrolízisének mechanizmusa:



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Hidrolízismódszerek kritériumai:

- teljes hidrolízist ad (az összes aminosav a legstabilabb kötésekből is felszabadul),
- az egyes aminosavakat nem vagy a lehető legkisebb mértékben károsítja,
- az alkalmazott reagens nem hoz létre mellékreakciókat.

Leggyakrabban a savas hidrolízises módszereket alkalmazzák.

A triptofán meghatározása során lúgos hidrolízist alkalmaznak, mert a triptofán indolcsoportja savas körülmények között gyakorlatilag kvantitativ elbomlik.

Enzimes hidrolízist aminosav-meghatározásra csak ritkán használnak annak ellenére, hogy ez az eljárás károsítja legkevésbé az aminosavakat.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Hat mólos sósavas hidrolízis

10 cm<sup>3</sup>-es orvosi ampullába a nyersfehérje-tartalomtól függően bemérünk 10–50 mg megfelelően előkészített mintát.

5 cm<sup>3</sup> 6 M-os, előzetesen nitrogénnel átbuborékolgatott sósavat adunk hozzá.

Leforrasztás után 110 °C-on ( $\pm 2$  °C) 24 órán át hidrolizáljuk, majd az ampulla tartalmát desztillált vízzel 50–100 cm<sup>3</sup>-es gömblombikba mossuk át.

Rotációs gyorsbepárlón (N-atmoszférában) 50 °C-os vízfürdőt alkalmazva, szárazra pároljuk.

A sűrűn folyós desztillációs maradékot pH=2,2-es citrátpufferben oldjuk fel, majd 25 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba töltjük, szűrjük.

Nagy fehérjetartalmú minták esetén az oszlopra történő felvitel előtt a hidrolizátumot nagymértékben hígítani kell.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az aminosavak károsodása a hidrolízis során:

- A fehérje hidrolízise során a triptofán indolcsoportja gyakorlatilag kvantitatíve elbomlik.
- A glutamin és az aszparagin savamidcsoportja ammóniára és a kérdéses aminosavra hasad.
- A szerin 10–15, a treonin 10–20%-ban bomolhat.
- A cisztin és a cisztein, valamint a metionin oxigén jelenlétében cisztein-szulfinsavvá és -szulfonsavvá, továbbá metionin-szulfoxiddá és -szulfonná alakulhat.
- Minimális mennyiségű bomlást szenvedhet a tirozin, a glutaminsav, az aszparaginsav, a prolin és az arginin is.
- Külön figyelmet érdemel a valin, az izoleucin és a leucin, mert ezen aminosavak kötéseik rendkívül nehezen szakadnak fel a hidrolízis során.



## Az aminosavak szétválasztása IEC-vel

Az aminosavak szétválasztását **növekvő pH-jú és növekvő nátriumion-koncentrációjú** citrátpufferek segítségével végezzük.

A savas- és hidrox-aminosavak gyorsabban, a bázikus aminosavak lassabban válnak le az oszlopról.

A semleges aminosavak közbülső értéket foglalnak el a két szélső csoport között.

Az aminosavakat pH=2,2-es pufferben visszük fel az ioncserélő oszlopra.

A savanyú és semleges aminosavak szétválasztását 0,2 M, pH=3,25 és pH=4,25 nátrium-citrát pufferekkel,

a bázikus aminosavak szétválasztását 0,35–0,85 M nátriumion-koncentrációjú pH=5,28–6,50 pufferekkel végezzük.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az alkalmazott kromatografálási feltételek mellett (pufferösszetétel, hőmérséklet, áramlási sebesség) az **aminosavak mindig ugyanolyan sorrendben eluálódnak** az oszlopról.

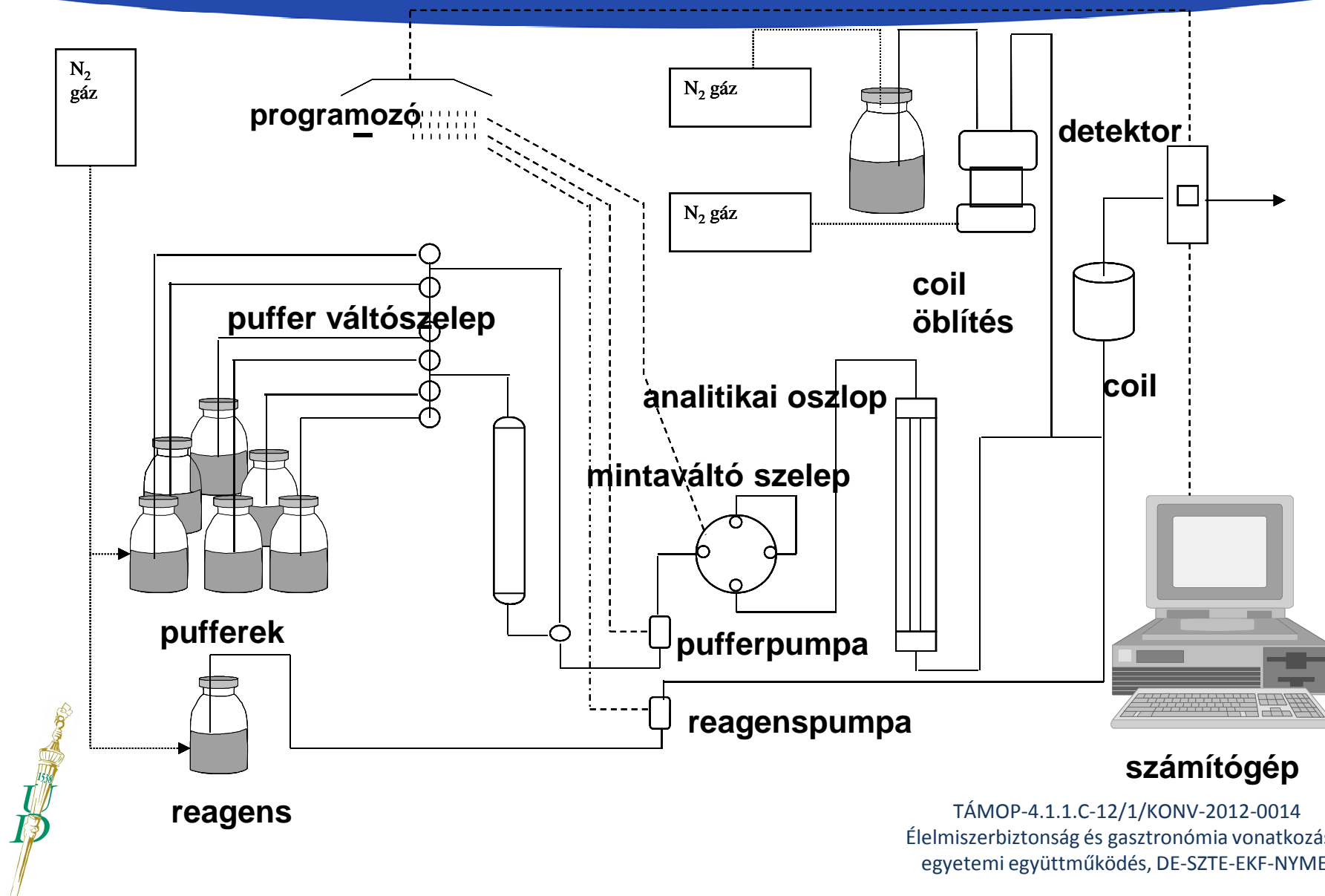
- elsőként mindig a legsavasabb aszparaginsav,
- utolsónak pedig a legbázikusabb arginin távozik.

A pufferek pH-jának és nátriumion-koncentrációjának, valamint a kromatografálás hőmérsékletének változtatásával **az aminosavak elúciós sorrendje megváltoztatható**, illetve az elúciós idők optimálhatók.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az aminosav-analizátor sematikus rajza



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## INGOS AAA aminosav- analizátor



TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

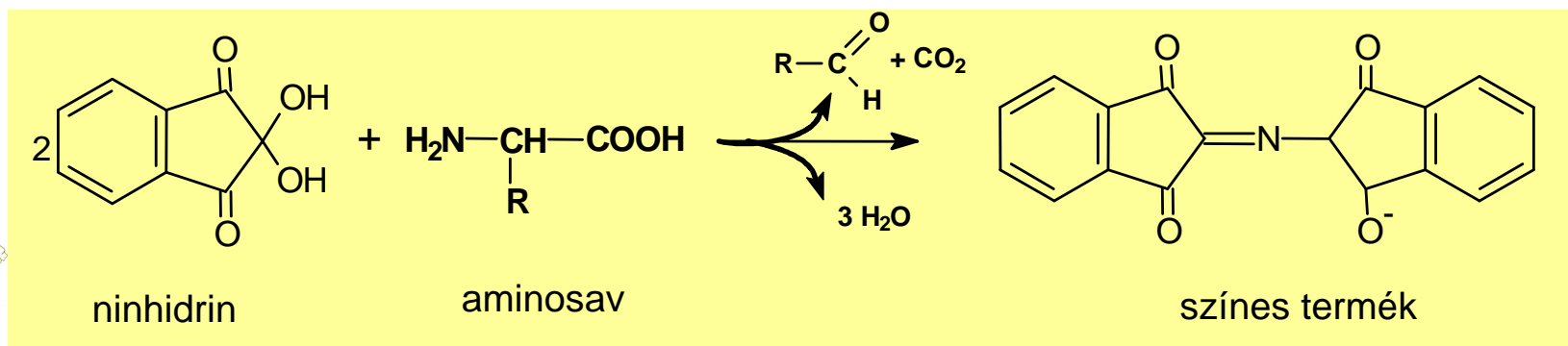
## Az aminosavak és a ninhidrin reakciója

Az aminosavak oldata színtelen, a meghatározáshoz az aminosavakat színessé kell tenni.

Az ioncserélő oszlopról távozó aminosavakat a keverőblokkban ninhidrinnel reagáltatva kékes, ibolyás-lilás színű vegyületet kapunk.

Az aminosavakkal létrejött szín intenzitását átfolyó küvettás fotométerben, 570 nm-en mérjük.

A prolint 440 nm-en fotometráljuk, mert a prolin és a ninhidrin közti színreakció sárga színű vegyületet eredményez.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az aminosavak minőségi és mennyiségi meghatározása

A fotométer által érzékelt fényabszorpciót a kompenzográf regisztrálja, amelynek eredménye a kromatogram.

A kromatogramon a csúcs helye mindig az aminosavra, a csúcs nagysága, illetve a csúcs alatti terület pedig az aminosav koncentrációjára jellemző.

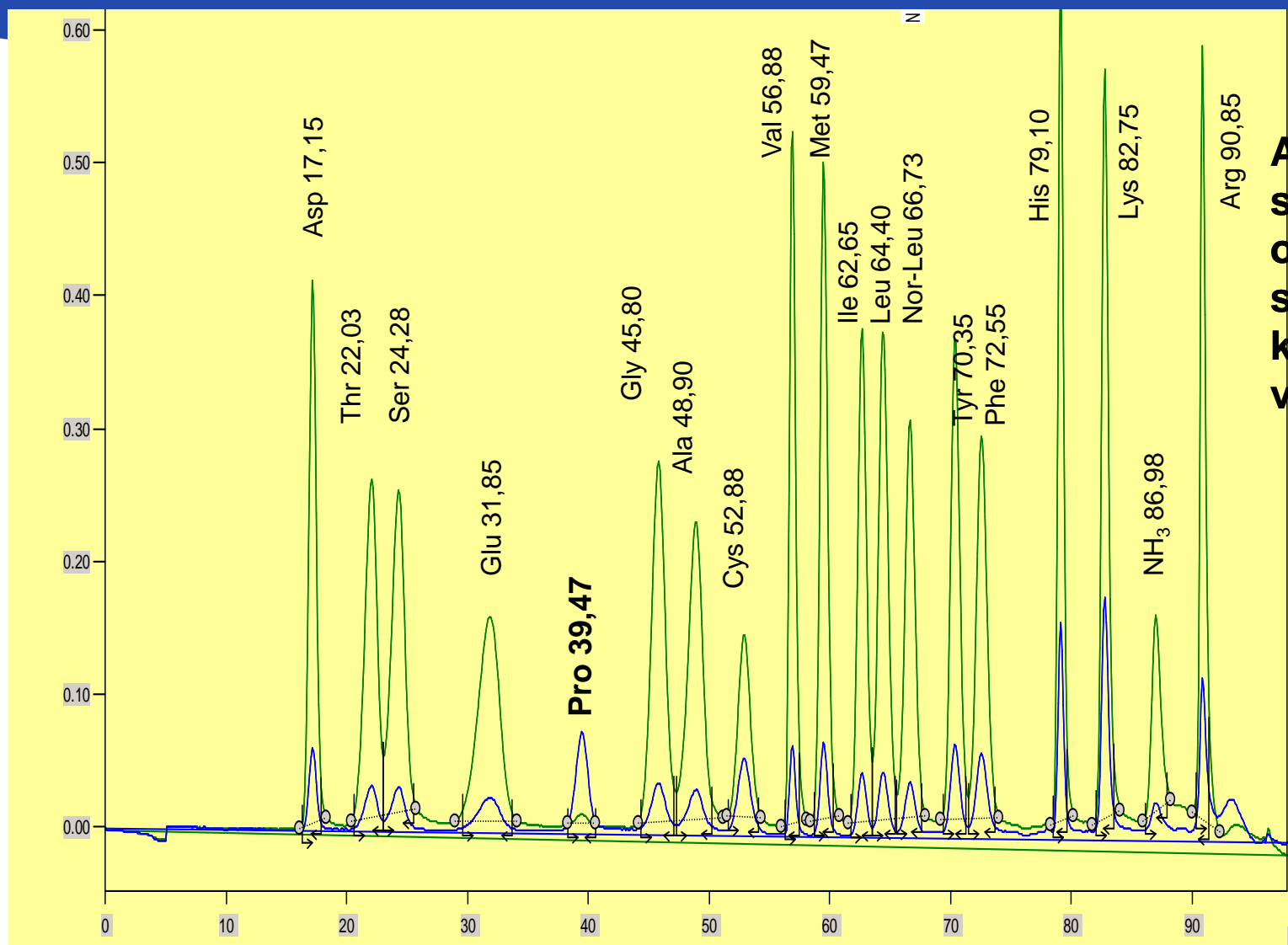
Az aminosav-analízissel eldönthető milyen aminosavak vannak jelen a mintában (a csúcs helye alapján), és hogy a jelen lévő aminosavnak milyen a koncentrációja (a csúcs nagysága alapján).

Az elkészült kromatogram csúcsainak megfelelő aminosav-mennyiségek kiszámítását ma már integrátorral, számítógéppel végezzük.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



**Az aminosavak  
szétválasztása  
oszlop utáni  
származék-  
képzéssel IEC-  
vel**



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Szabad aminosavak és egyéb ninhidrin-pozitív vegyületek meghatározása fiziológias oldatokból

Az előkészítő műveletek bonyolultsága miatt nehéz feladat.

A leggyakoribb probléma a zavaró anyagok eltávolítása.

- A legtöbb esetben ezek kisebb-nagyobb molekulatömegű fehérjék, esetenként nagy koncentrációban jelen lévő ásványi anyagok.
- A fehérjétől különböző fehérjekicsapó szerekkel lehet megszabadulnunk.
- Az ásványi anyagokat csapadék formájában, dialízissel vagy ultraszűréssel lehet a mintából eltávolítani.

Mind a fehérjék, mind az ásványi anyagok csapadék formában való eltávolításakor potenciális veszélyforrás, hogy a szabad aminosavak egy része adszorbeálódhat a csapadék felületén, ami ronthatja a meghatározás pontosságát.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A fehérjealkotó aminosavak mellett jelen lévő egyéb ninhidrin-pozitív csúcsok nehezé teszik a beazonosítást.

Speciális probléma a savas és a hidrox-aminosavak mellett az **aszparagin** és a **glutamin** szelektív elválasztása.

## A szelektív elválasztást általában elősegíti:

- Ha az eluálást alacsonyabb hőmérséklettől indítjuk,
- ha a savas aminosavakat eluáló puffer pH-ját csökkentjük,
- ha a puffer átfolyási sebességét csökkentjük,
- ha a bázikus aminosavak kromatografálásához kisebb pH-jú puffert és hosszabb gyantaoszlopot alkalmazunk,
- ha Na-pufferek helyett Li-puffereket használunk.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Li-pufferes eljárás

### A Na-pufferekről Li-pufferekre való átállás:

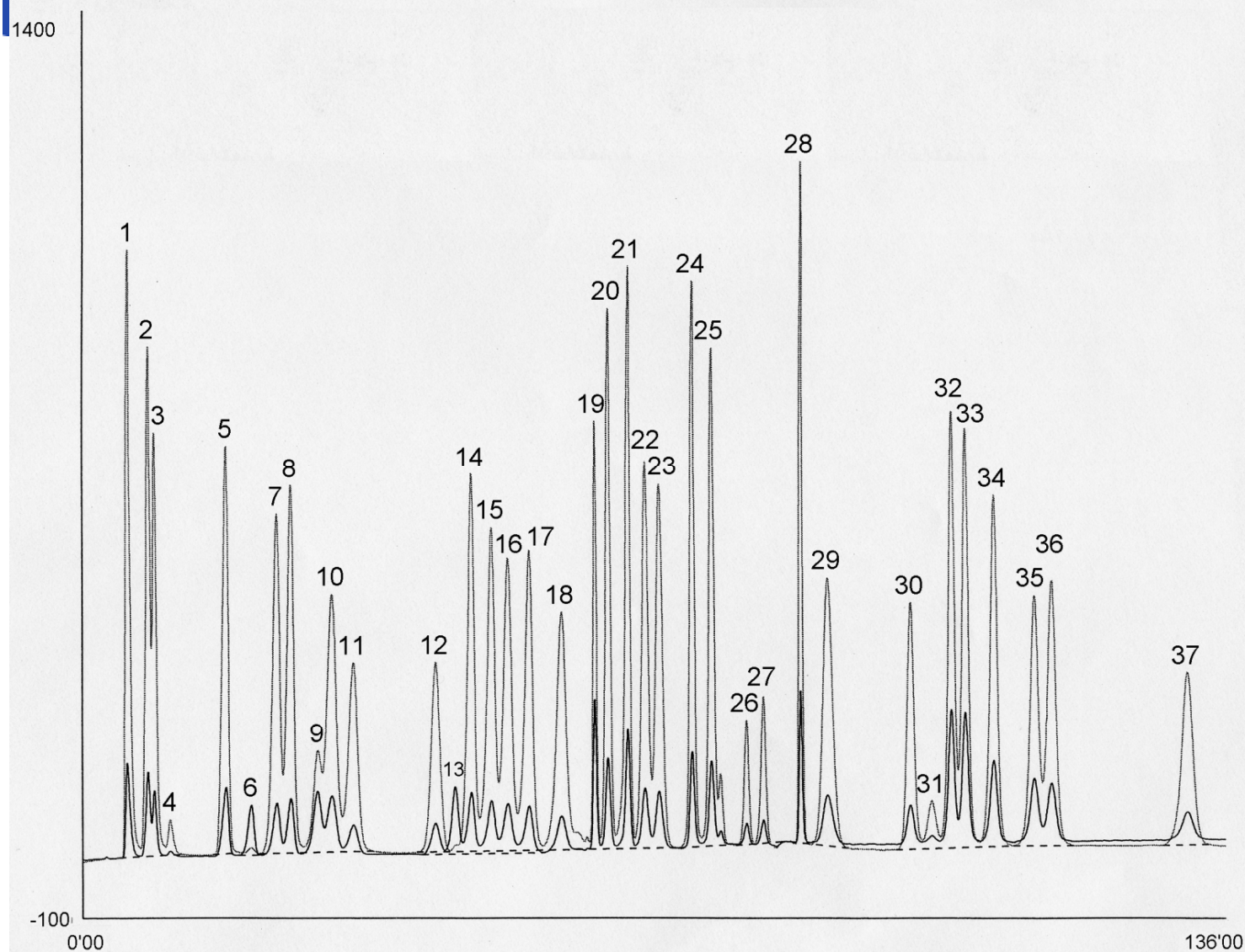
- A Na-formában lévő gyantát 6 M salétromsavval mossuk.
- 0,3 M Li-hidroxiddal Li formába hozzuk.
- Elvégezzük az ekvibrálást az első Li-pufferrel.

### Meghatározás menete:

- A minta oldására és oszlopra vitelére célszerű pH=2,2, 0,3 M Li-citrát puffert használni.
- Az eluálás pH=2,80; 0,3 M Li-citrát pufferrel kezdődik 39 °C-on.
- 70 perc múlva pH=4,10; 1,2 M Li-citrát pufferrel folytatódik 60 °C-on.
- Ezzel a pufferrendszerrel az eluálás 450 percig tart, és mintegy 100 ninhidrin-pozitív vegyületet lehet azonosítani, illetve meghatározni.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



**Fiziológiás oldat  
szabad  
aminosavainak  
meghatározása  
lítium pufferek  
alkalmazásával**

'1/KONV-2012-0014

Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A kromatogramon látható komponensek

- |                               |                            |   |
|-------------------------------|----------------------------|---|
| 1. Ciszteinsav                | 14. Glicin                 | 27. $\beta$ -amino-izovajsav            |
| 2. Taurin                     | 15. Alanin                 | 28. $\gamma$ -amino-vajsav              |
| 3. Foszfoserin                | 16. Citrullin              | 29. Klórfenilalanin<br>(belső standard) |
| 4. Karbamid                   | 17. $\alpha$ -amino-vajsav | 30. Etanolamin                          |
| 5. Aszparaginsav              | 18. Valin                  | 31. Ammónia                             |
| 6. Hidroxiprolin              | 19. Cisztin                | 32. Ornitin                             |
| 7. Treonin                    | 20. Metionin               | 33. Lizin                               |
| 8. Szerin                     | 21. Cisztation             | 34. Hisztidin                           |
| 9. Aszparagin                 | 22. Izoleucin              | 35. 1-metil-hisztidin                   |
| 10. Glutaminsav               | 23. Leucin                 | 36. 3-metil-hisztidin                   |
| 11. Glutamin                  | 24. Tirozin                | 37. arginin.                            |
| 12. $\alpha$ -amino-adipinsav | 25. Fenilalanin            |   |
| 13. Prolin                    | 26. $\beta$ -alanin        |   |



## Az aminosav-összetétel meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiánál az álló fázis valamilyen nagy viszkozitású folyadék vagy nagy felületű anyag.

Ezt általában rozsdamentes acélcsőbe préselik, amelyen keresztül az oldószert pumpa segítségével, nagy nyomáson áramoltatják.

Amennyiben az eluens kevésbé poláros, mint az állófázis, normál fázisú kromatográfiáról, amennyiben az eluens polárosabb mint az állófázis, fordított fázisú kromatográfiáról beszélünk.

Az eluens folyamatosan áramlik keresztül az oszlopon.

Az egyes komponensek eltérő sebességgel haladnak keresztül az oszlopon, és optimális esetben egymástól jól elkülönülve jelennek meg a HPLC oszlop végén.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az oszlop végén a komponensek különböző módszerekkel detektálhatók.

A detektor lehet:

- Látható vagy ultraibolya fotométer,
- fluoreszcenciás detektor.

A detektort mindig a szétválasztandó komponensek tulajdonságai alapján választják meg.

Az aminosavak meghatározhatók nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, oszlop előtti származékképzéssel.

Származékképzésre az o-ftálaldehidet, a fluorenil-metil-kloroformátot és a fenil-izotiocianátot használják a legszélesebb körben.

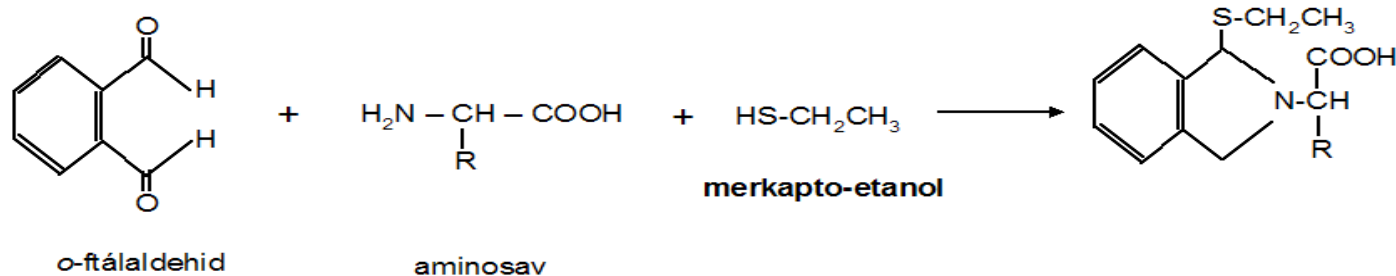
Detektálásra leginkább a fluoreszcens detektort használják, amelynek érzékenysége jobb, mint a látható, illetve UV-tartományban mérő detektoroké.



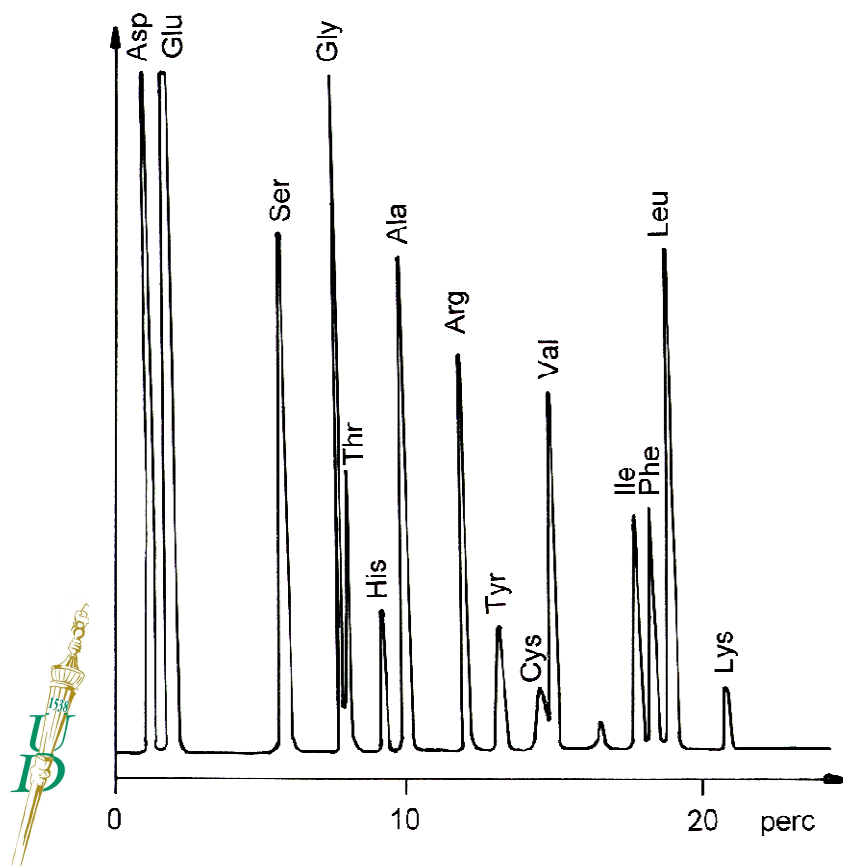


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Származékképzés OPA / ME eleggyel



Az aminosavak szétválasztása oszlop előtti származékképzés után HPLC-vel



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Ha a származékképző reagens egy királis szénatomot is tartalmaz, akkor lehetőség van a D- és az L-aminosav-enantiomerek szétválasztására és meghatározására.

Leggyakrabban az **1-(9-fluorenil)-etil-kloroformátot (FLEC)** és az **orto-ftálaldehidet, valamint a 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- $\beta$ -D-glükopiranozidot (OPA/TATG)** használják ilyen célra.

A mérés azért fontos, mert a különböző technológiai beavatkozások (magas hőmérséklet, lúgos kezelés, detoxikáció) hatására az L-aminosavak egy része átalakulhat D-aminosavvá.

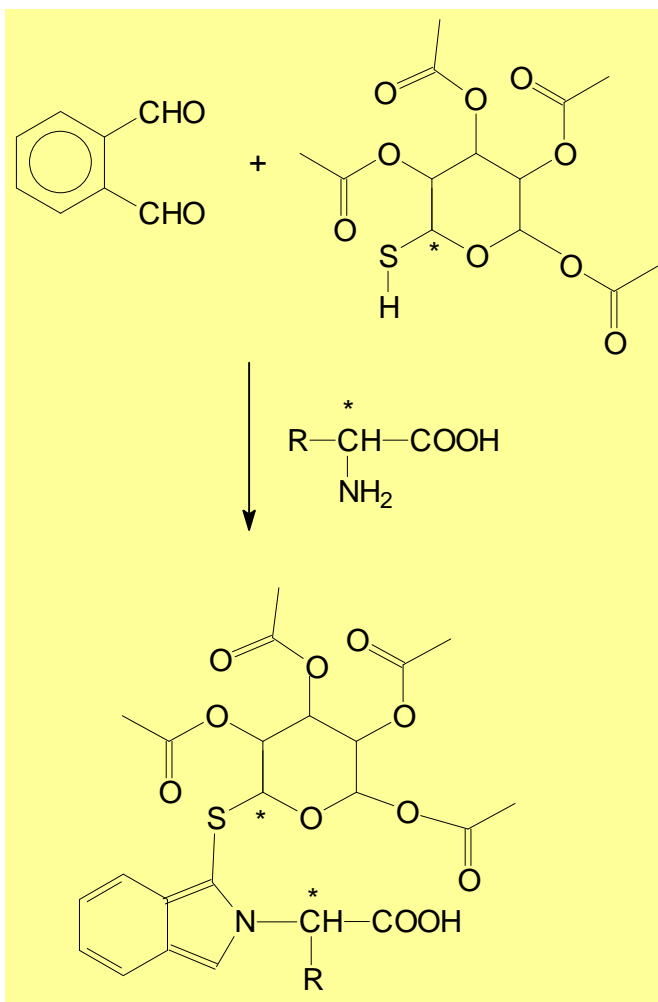
Ezeket az ember és a legtöbb állat nem tudja hasznosítani, sőt káros hatásait is kimutatták az élő szervezetre.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

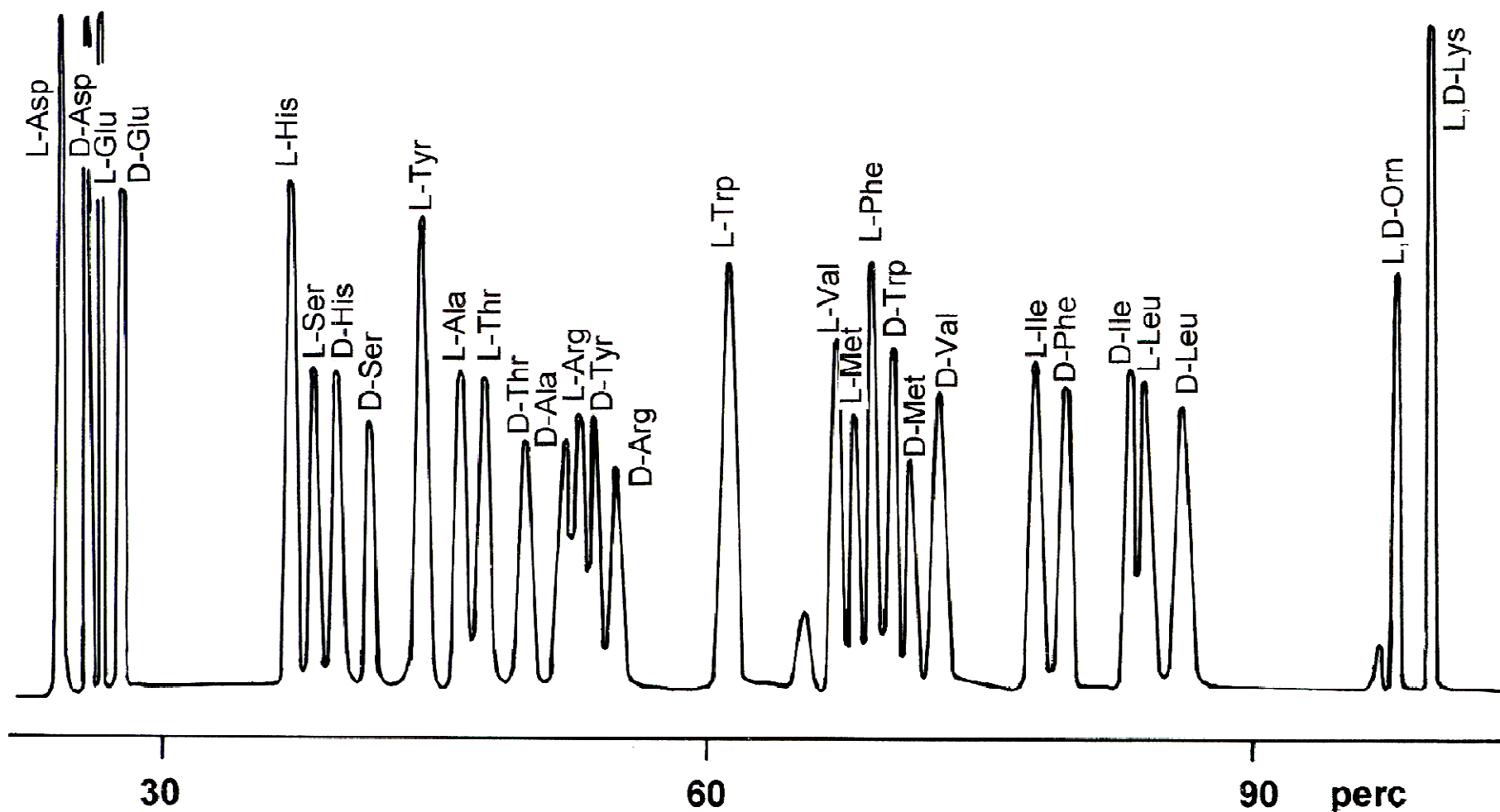
## A királis származékképzés mechanizmusa

o-ftálaldehid

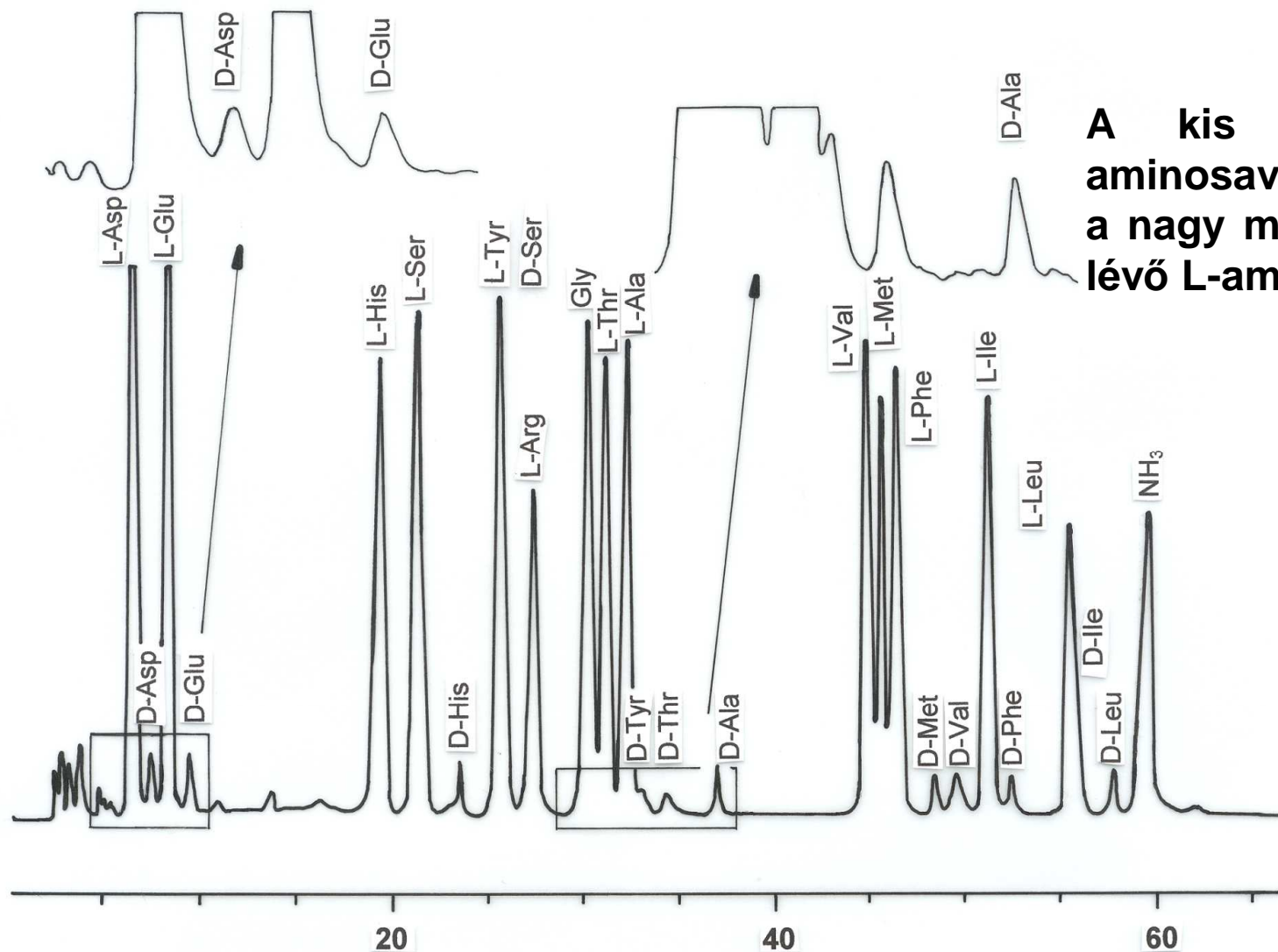


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az aminosav-enantiomerek szétválasztása OPA/TATG származékképzés után



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



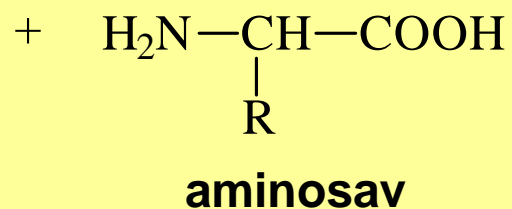
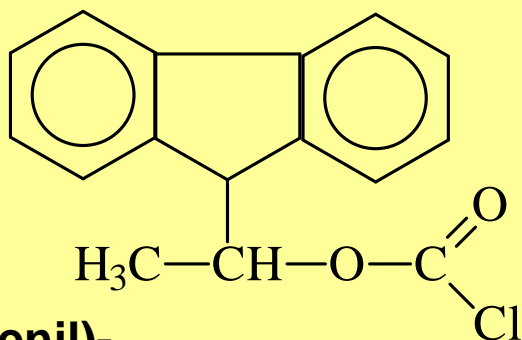
**A kis mennyiségű D-aminosavak meghatározása a nagy mennyiségben jelen lévő L-aminosavak mellett**



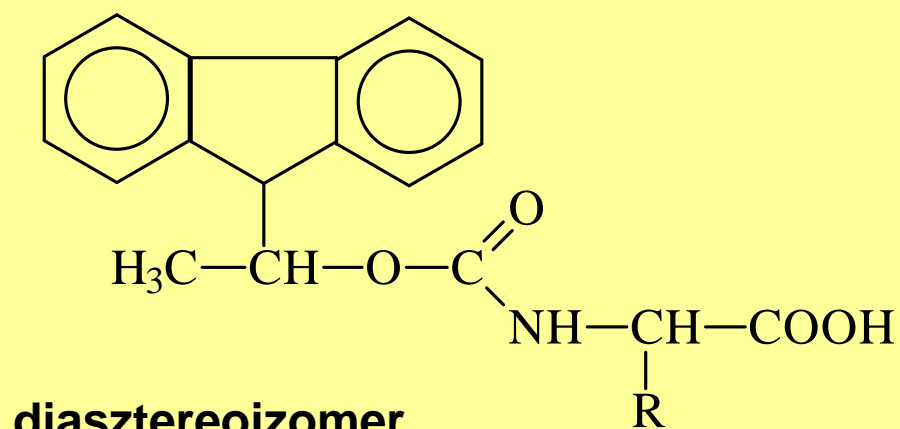
# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Származékképzés FLEC reagenssel

1-(9-fluorenil)-  
etil-kloroformát  
(FLEC)



↓ -HCl

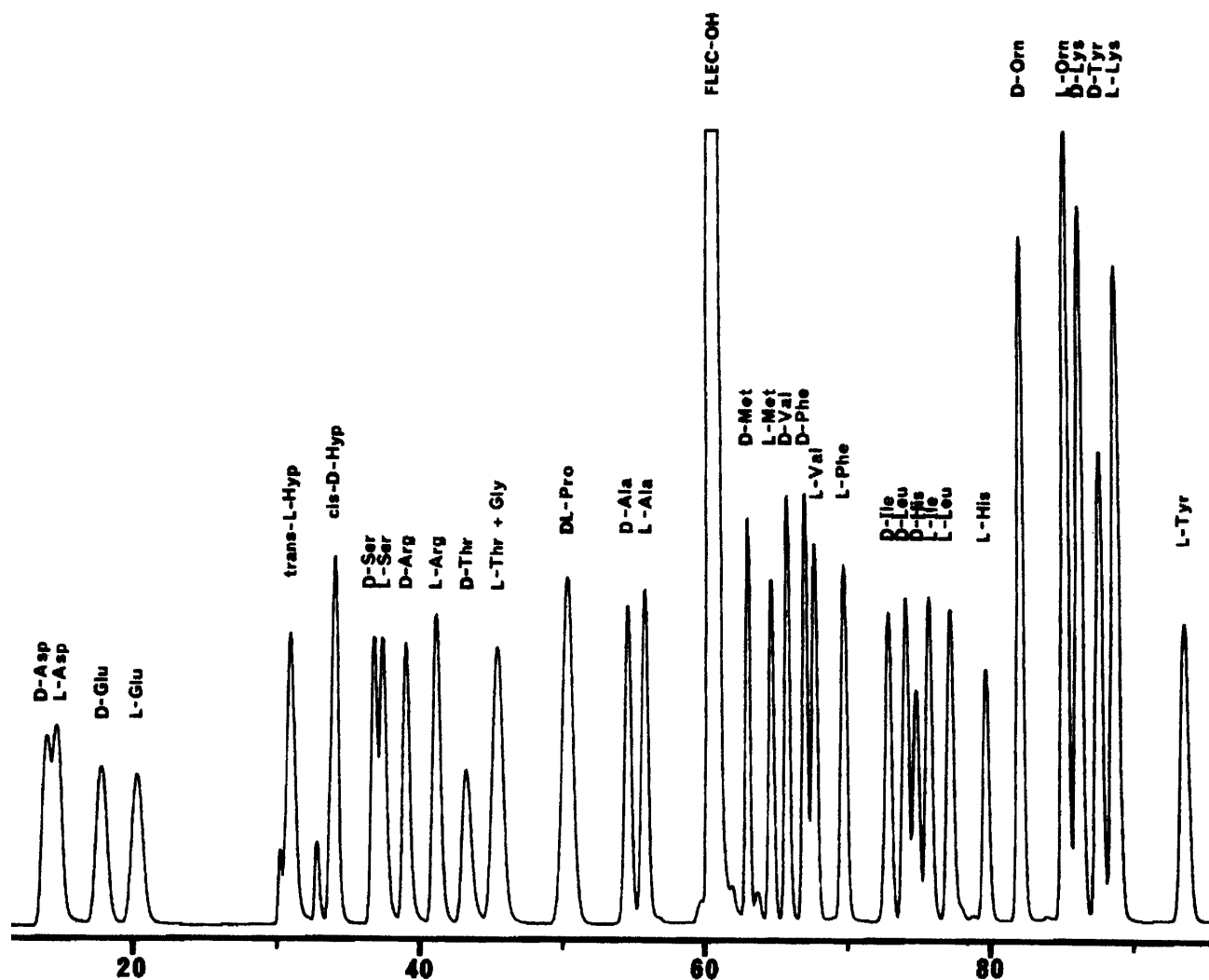


diasztereoizomer  
származék



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Az aminosav  
enantiomerek  
**(+)FLEC-kel**  
képzett  
származékainak  
szétválasztása



ÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
területi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

## A cisztintartalom meghatározása IEC-vel

- A módszer alkalmas élelmiszerek cisztintartalmának meghatározására.
- A kéntartalmú aminosavak rendkívül hajlamosak az oxidációra.
- Az analízis közben fellépő veszteség elkerülése érdekében célszerű a kéntartalmú aminosavakat oxidált formában (ciszteinsav) meghatározni.
- A fehérje hidrolízise előtt perhangyasavas oxidációval a cisztint és a ciszteint ciszteinsavvá alakítjuk át, majd a ciszteinsavat ioncserés oszlopkromatográfiával aminosav-analizátorral határozzuk meg.



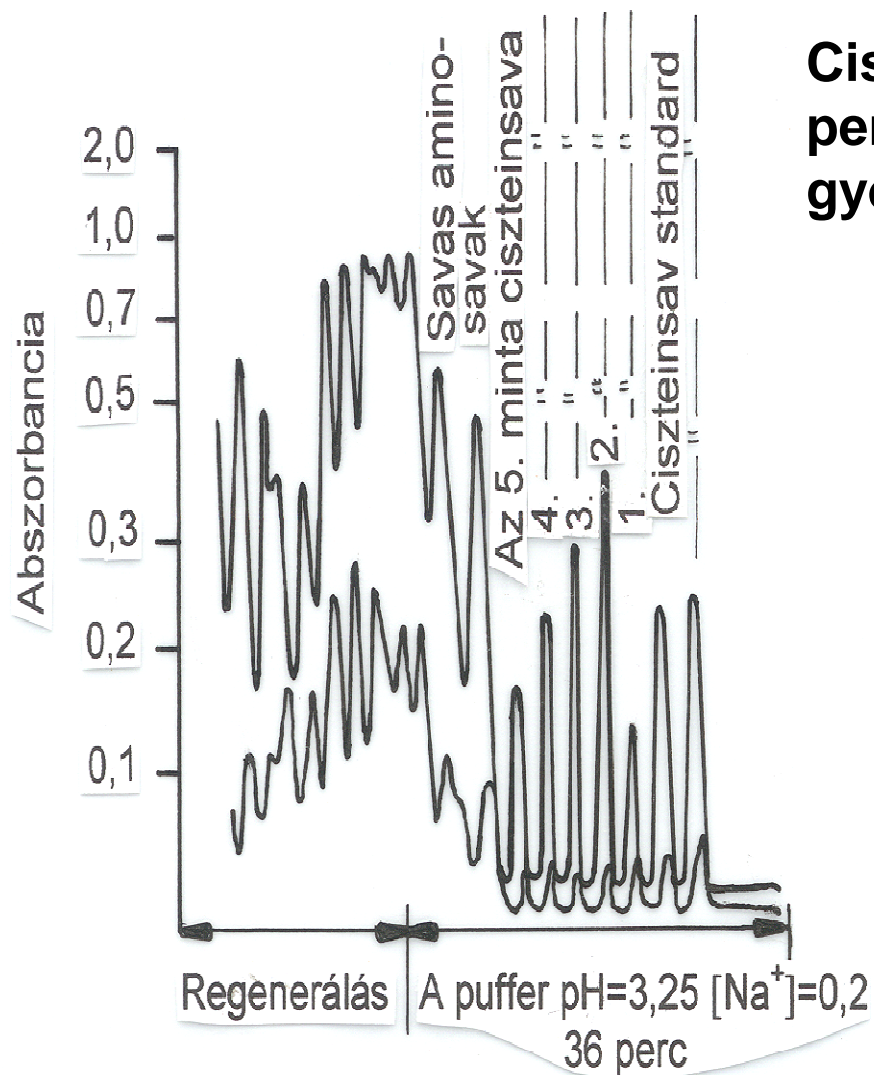


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

- A ciszteinsav meghatározását egy olyan mintaadagolóval ellátott bármely aminosav-analizátorral elvégezhetjük, amelynél lehetséges az áramlási paraméterek lényeges megváltoztatása nélkül egymás után több mintát juttatni az ioncserélő oszlopra.
- Egy minta ciszteinsav-tartalmának meghatározásakor a ciszteinsav és az aszparaginsav között egy olyan üres területet kapunk a kromatogramon, ahova még az áramlási paraméterek figyelembevételével további 3–5 minta ciszteinsavának csúcsa beférne.
- 2–3 percenként öt különböző, perhangyasavval oxidált mintát juttatunk az ioncserélő oszlopra.
- Az 5. minta ciszteinsav csúcsának megjelenése után az analízist megszakítjuk, az ioncserélő oszlopot regeneráljuk, és folytatjuk a további minták analízisét.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



**Cisztintartalom meghatározása  
perhangyasavas oxidációval és  
gyorsított betáplálással**



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A triptofántartalom meghatározása

A triptofán indolcsoportja savas hidrolízisnél (különösen nagy szénhidráttartalmú minták esetében) kvantitatíve elbomlik.

A triptofán meghatározása során lúgos hidrolízist kell alkalmazni.

A lúgos hidrolízis történhet bárium- vagy nátrium-hidroxiddal.

A meghatározásra mind az IEC, mind a para-dimetil-amino-benzaldehiddel és nátrium-nitrittel képzett kék színű termék koncentrációjának spektrofotometriás meghatározása 590 nm-en alkalmas.

### Lúgos hidrolízis NaOH-dal

- A 10 cm<sup>3</sup>-es ampullába a nyersfehérje-tartalomtól függően 50–100 mg-ot mérünk be a mintából.
- 5 cm<sup>3</sup> 5 M NaOH-oldatot adunk hozzá, üvegkapillárison keresztül 3–5 percen át nitrogéngázt vezetünk az ampullába, leforrasztjuk.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

- Szárítószekrényben a mintát  $110 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ -on 24 órán át hidrolizáljuk.
- Lehűlés után az ampulla tartalmát  $\text{pH} = 4,25$  nártium-citrát pufferrel  $25 \text{ cm}^3$ -es mérőlombikba mossuk.
- A minta  $\text{pH}$ -ját tömény sósavval  $\text{pH} = 4$ -re állítjuk be, majd citrátpufferrel jelig töltjük.

## Lúgos hidrolízis $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -dal

- A mintából 10–100 mg-ot mérünk be a nyersfehérje-tartalom függvényében.
- 10 mg fehérjéhez 1,26 g  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -ot és  $1,45 \text{ cm}^3$  desztillált vizet mérünk hozzá.
- Üvegkapillárison keresztül 2–3 percig nitrogéngázt vezetünk az ampullába, leforrasztjuk.
- A mintát szárítószekrényben  $110 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ -on 48 órán át hidrolizáljuk.
- A hidrolizátumot  $50 \text{ cm}^3$ -es Erlenmeyer-lombikba öntjük át, az ampullát  $3 \times 2 \text{ cm}^3$  forró desztillált vízzel átöblítjük.

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

- 1 csepp fenolftaleinindikátort adunk hozzá, és 6 M sósavval közömbösítjük.
- A bemért  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -től függően 5–10 g vízmentes nátrium-szulfátot adunk a közömbösített oldathoz.
- A kivált  $\text{BaSO}_4$  csapadékot szűrjük vagy centrifugáljuk.
- A csapadékot desztillált vízzel átmossuk, az egyesített vizes fázisokat liofilizáljuk.
- A liofilizálás után kapott bepárlási maradékot  $\text{pH} = 4,25$ -ös nátrium-citrát pufferben feloldjuk.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A triptofántartalom mérése IEC-vel aminosav-analizátoron

Az elválasztás elve és körülményei megegyeznek az aminosav-analízisnél leírtakkal, a különbségek:

15 cm<sup>3</sup>-es rövid ioncserélő oszlopot használunk,

az oszlop hőmérséklete 55–60 °C,

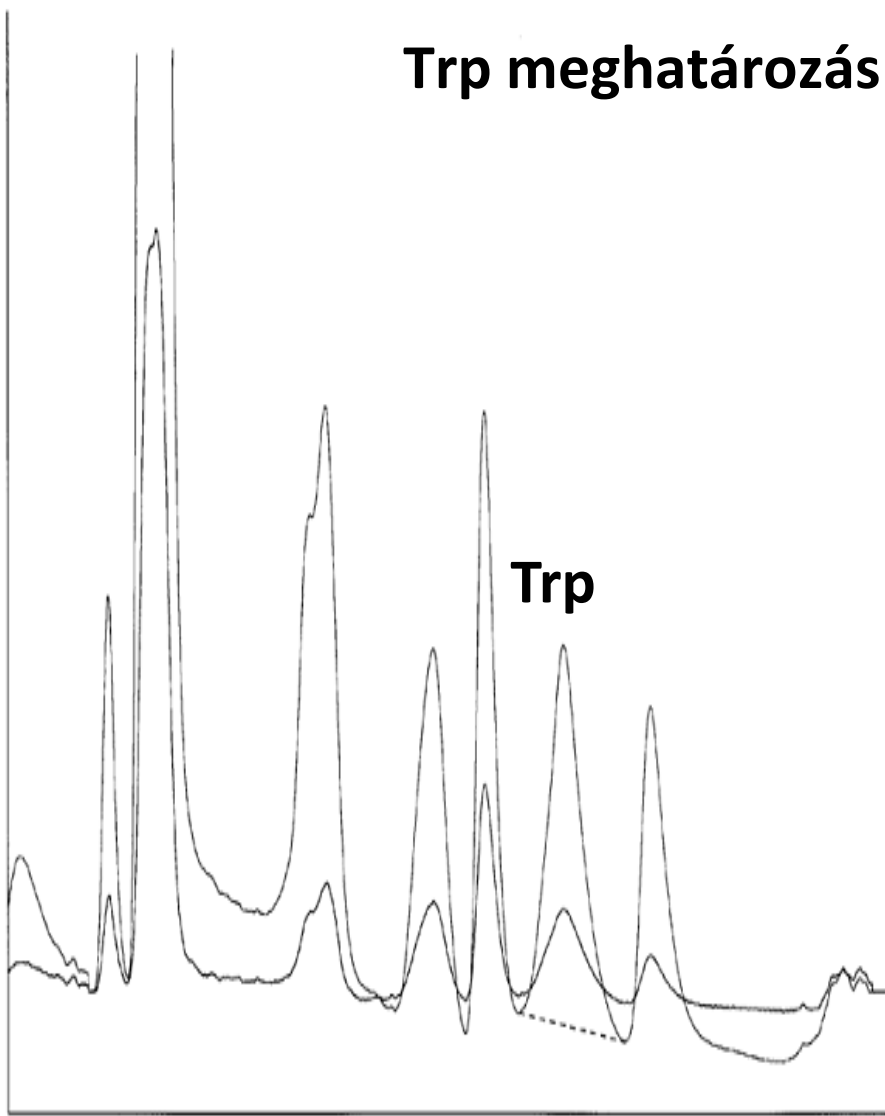
eluensként a legmagasabb pH-jú és molaritású nátrium-citrát puffert használjuk.

Az eredményt két, párhuzamos mérés átlagában, a minta tömeg%-ában adjuk meg.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Trp meghatározás rövid oszlopon IEC-vel



## A hasznosítható lizintartalom meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiás módszerrel

Megfelelő körülmények között 2,4-dinitro-1-fluor-benzollal reagáltatjuk a minta fehérjéjében lévő lizint (dinitro-fenil- $\epsilon$ -amino-lizin származék képződik).

A DNFB-lal csak szabad  $\epsilon$ -aminocsoporttal rendelkező lizin reagál.

E származék a savas hidrolízis során nem bomlik le, aminosav-analizátorral meghatározható.

Az élelmiszerek összeállításánál mindig a hasznosítható lizintartalommal kell számolni.

Az  $\epsilon$ -aminocsoportján blokkolt lizin az emberi és az állati szervezetben rosszabbul hasznosul.





## Monoszacharidok szétválasztása és meghatározása HPLC-vel

A monoszacharidokat és a diszacharidokat különböző kromatográfiás technikával, elsősorban HPLC-vel szét lehet választani, illetve meg lehet határozni.

A cukrok szétválasztására és meghatározására mindaz érvényes, ami a korábbi HPLC elválasztás során tárgyalásra került.

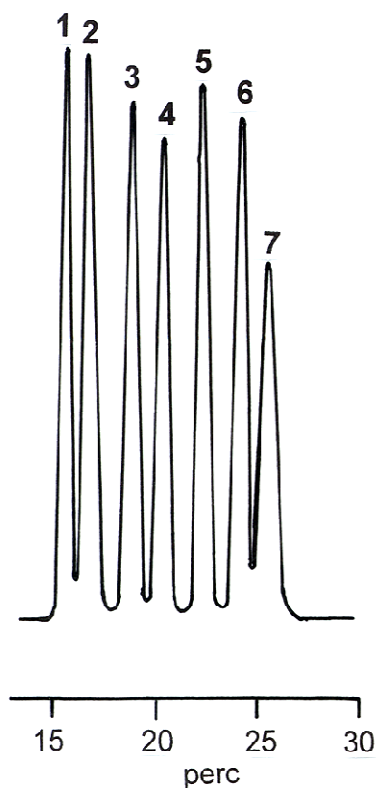
A különbség annyi, hogy eluensként vizet vagy rendkívül híg savanyú oldatot használunk.

A speciális, cukrok szétválasztására és meghatározására kifejlesztett oszlopok mellett szinte minden elválasztásnál és meghatározásnál törésmutató mérő detektort használunk.

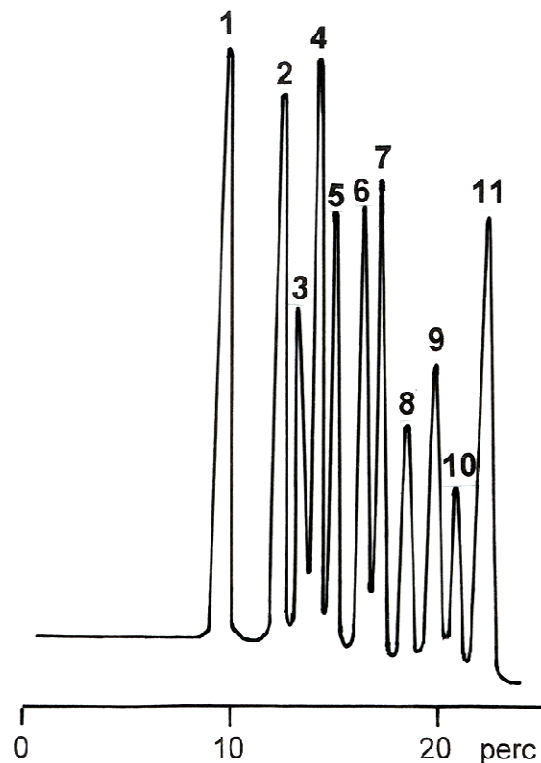


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

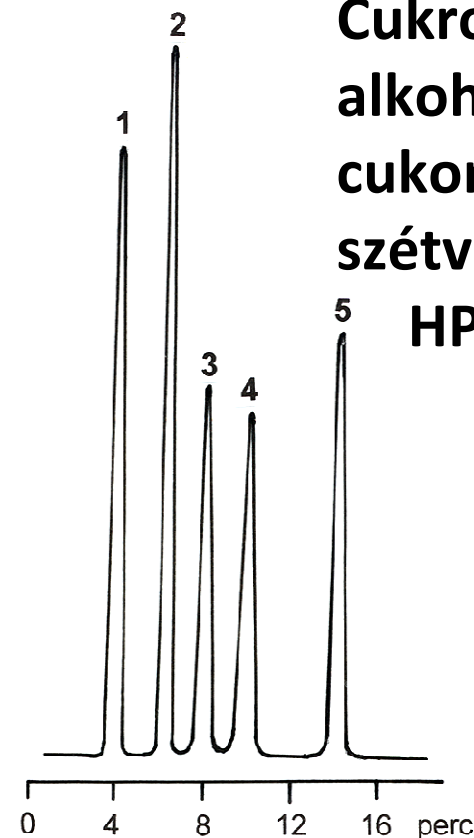
**Cukrok, savak,  
alkoholok és  
cukoralkoholok  
szétválasztása  
HPLC-vel**



1. Szukróz; 2. Glükóz;  
3. Citromsav; 4. Izocitromsav;  
5. Borkősav; 6. Almasav;  
7. Glicerín



1. Szukróz; 2. Maltóz; 3. Glükóz;  
4. Xilóz; 5. Galaktóz; 6. Arabinóz;  
7. Mannóz; 8. Ecetsav; 10. Metanol;  
11. Etanol



1. Borkősav;  
2. Szacharóz;  
3. Glükóz; 4. Fruktóz;  
5. Szorbit

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

## A provitaminok és a vitaminok meghatározása HPLC-vel

Élelmiszerek provitaminjainak és vitaminjainak meghatározása a többi komponenshez viszonyítva relatíve összetett analitikai feladat, mert:

- koncentrációjuk kicsi a többi komponenshez képest,
- a legtöbb vitamin érzékeny az oxidációra és néhány még a fényre is.

Csak kíméletes analitikai műveletekkel lehet analizálni.

A vitaminok kémiai összetételüket tekintve sokfélék, meghatározásukra általános eljárást nem lehet kidolgozni, csak egyedi analitikai műveletekkel lehet őket elemezni.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

Meghatározásuk legtöbbször különböző **előkészítési műveleteket** is igényel.

- A legtöbb esetben a meghatározás előtt a zavaró anyagokat el kell távolítani, a vitaminokat extrakcióval ki kell vonni.
- A kötött formában lévőket kötéseikből fel kell szabadítani, majd ezután következhet az azonosítás és a mennyiségi meghatározás.
- A zsírolldható vitaminok kivonását szerves oldószeres extrakcióval végezzük, a vízoldható vitaminokat pedig vízzel vagy pufferoldattal nyerjük ki a vizsgálandó anyagból.
- A kivonás után az extraktumot általában kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, majd tisztítás után alkalmazhatjuk a klasszikus analitikai módszereket, fotometriás és kolorimetriás, spektrofotometriás, fluorimetriás és főként kromatográfiás eljárásokat.



## Az A-vitamin-tartalom meghatározása

A módszer alkalmas élelmiszerek A-vitamin-tartalmának meghatározására.

Az eljárás során a megfelelően előkészített mintát lúgos közegben hidrolizáljuk, a felszabadult retinolt pedig petroléterrel extraháljuk.

Az extraktumot bepároljuk, metanolban feloldjuk, a retinoltartalmat pedig HPLC-vel, fordított fázisú kromatográfiával, UV detektálással, 325 nm hullámhosszon határozzuk meg.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A minta hidrolízise

Az A-vitamin-tartalomtól függően 5–15 g mintát Erlenmeyer-lombikba mérünk.

Hozzáadunk 50 cm<sup>3</sup> etil-alkoholt, 2 cm<sup>3</sup> 3%-os Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-oldatot, 2 cm<sup>3</sup> 10%-os aszkorbinsav-oldatot és 1 cm<sup>3</sup> 0,1%-os metanolban oldott BHT-t, végül 10 cm<sup>3</sup> 60%-os KOH-oldatot.

A lombikot 30 percre nitrogénáram mellett 70 °C-os hőmérsékletű vízfürdőbe merítjük.

A melegítés után a hűtőt etil-alkohollal leöblítjük, és a lombikot vízcsap alatt szobahőmérsékletűre lehűtjük.

A hidrolizátumot 50 cm<sup>3</sup> vízzel, majd etil-alkohollal az oldhatatlan részekkel együtt 200 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba mossuk, majd etil-alkohollal jelig töltjük.

A bedugaszolt mérőlombikot többszöri átforgatással elegyítjük, majd sötétben 15 percig ülepedni hagyjuk.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Extrakció

Rázótölcsérbe  $50\text{ cm}^3$  10%-os NaCl-oldatot és  $50\text{ cm}^3$  petrolétert mérünk.

A mérőlombikban lévő felülúszóból ehhez pipetázunk hozzá, az A-vitamin-tartalom függvényében,  $10\text{--}100\text{ cm}^3$ -t.

A rázótölcsért bedugaszoljuk, egy percre intenzíven rázzuk, majd a fázisok szétválása után az alsó fázist egy  $400\text{ cm}^3$ -es főzőpohárba engedjük le.

A felső fázist Erlenmeyer-lombikba töltjük, és sötét helyre tesszük.

Az alsó fázis kirázását még kétszer  $50\text{--}50\text{ cm}^3$  petroléterrel megismételjük.

Az egyesített petroléteres fázisokat  $10\text{ g}$  vízmentes  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -tal víztelenítjük.

A petrolétert max.  $40\text{ }^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten bepároljuk úgy, hogy az extraktum térfogata kb.  $5\text{ cm}^3$ -re csökkenjen.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az extraktum feldolgozása:

A petroléteres extraktumhoz 5 cm<sup>3</sup> metanolt adunk, és a rotációs bepárlón térfogatát 2 cm<sup>3</sup>-re csökkentjük.

A maradékot 2 cm átmérőjű G4-es üvegszűrőn keresztül, vákuumszűrő segítségével, 10 cm<sup>3</sup>-es kalibrált kémcsőbe szűrjük.

A gömblombikot a szűrőn át metanollal a kémcsőbe mossuk, és a kémcső térfogatát 10 cm<sup>3</sup>-re állítjuk be.

Az így nyert oldat 1 hétig alkalmas az A-vitamin-tartalom meghatározására.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## HPLC analízis

Az előkészített oldat 20 µl-ét injektáljuk a HPLC-be.

Az elválasztást 25 cm hosszú, 7–10 µm szemcsenagyságú, C18 típusú fordított fázisú kromatográfiával végezzük.

A retinolcsúcsot annak retenciós ideje alapján azonosítjuk.

A mennyiségi meghatározáshoz egy retinil-acetát alapoldatot használunk, amely izopropil-alkoholban oldva tartalmazza az A-vitamint.

A retinil-acetát mérőoldatot a mintával teljesen megegyező módon készítjük elő az A-vitamin meghatározásához.

Az így előkészített standardoldatból a mintához hasonlóan 20 µl-t injektálunk a HPLC analitikai oszlopára, és ezt követően a standard és a minta csúcs alatti területének összehasonlítása után a minta A-vitamin-tartalma számolható.



## A D<sub>3</sub>-vitamin meghatározása

A módszer alkalmas vitamin-alapanyagok és kiegészítők D<sub>3</sub>-vitamin-tartalmának meghatározására.

A módszer szerint a mintát metanollal extraháljuk.

A kapott metanolos oldatból szűrés vagy centrifugálás után 50 µl-t injektálunk a HPLC készülékbe.

Az abszorbanciát 265 nm-nél mérjük.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A meghatározás menete

A mintából a vitamintartalom függvényében 1–10 grammot mérünk be egy 100 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer-lombikba.

Hozzáteszünk 50 cm<sup>3</sup> metanolt, és a gondosan lezárt lombikot 2 x 10 percre ultrahang fürdőbe helyezzük.

Az ultrahangozás után az oldatot vákuumban szűrjük vagy centrifugáljuk, a tiszta oldatot vákuumban 3–4 cm<sup>3</sup>-re bepároljuk, majd eluenssel (metanol–acetinitril 1:4) 6 cm<sup>3</sup>-re egészítjük ki.

A meghatározást 250 x 4,6 mm-es ODS HIP-5 kromatográfiás oszlopon végezzük.

A D<sub>3</sub>-vitamin csúcsát 10–11 perc retenciós idő után 265 nm-en detektáljuk.

1,25 µg/cm<sup>3</sup>, 2,5 µg/cm<sup>3</sup> és 5,00 µg/cm<sup>3</sup> koncentrációjú D-vitamin-tartalmú standardoldatok segítségével hitelesítő-görbét veszünk fel.

A hitelesítő görbe segítségével a minta ismeretlen D<sub>3</sub>-vitamin-tartalma meghatározható.



## E-vitamin ( $\alpha$ -tokoferol) meghatározása

A módszer alkalmas vitaminalapanyagok, kiegészítők E-vitamin-tartalmának meghatározására.

Élelmiszerek E-vitamin-tartalma a természetes tokoferoltartalom, valamint a természetes és hozzáadott tokoferol-acetát hidrolíziséből származó  $\alpha$ -tokoferol összege.

A megfelelően előkészített mintát lúgos közegben hidrolizáljuk, a hidrolízis végén az elegyet sósavval megsavanyítjuk.

A felszabadult  $\alpha$ -tokoferolt petroléterrel extraháljuk, az extraktumot bepároljuk és metanolban feloldjuk.

Az  $\alpha$ -tokoferol-tartalmat HPLC-vel, fordított fázisú kromatográfiával, UV detektálással, 292 nm hullámhosszon határozzuk meg.



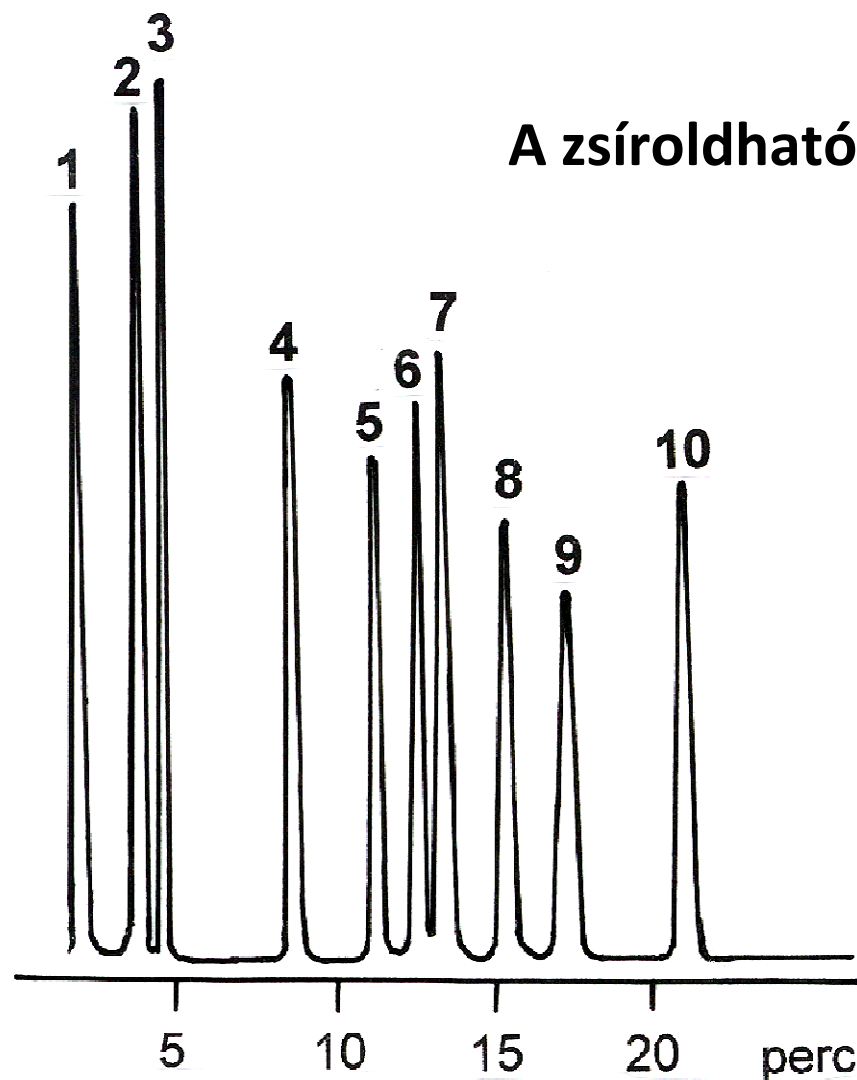
## A zsíroldható vitaminok szimultán meghatározása HPLC-vel

A zsíroldható vitaminok a megfelelően megválasztott kromatográfiás körülmények között egy lépésben is szétválaszthatók, illetve meghatározhatók.

A szétválasztás körülményei az alábbiak:

- Oszlop: 150 x 4 mm GRA-SIL 120 ODS-5 ST 5  $\mu\text{m}$ ,
- acetonitril mozgó fázis 0,8  $\text{cm}^3/\text{perc}$  áramlási sebességgel,
- 7 MPa nyomás, 30 °C hőmérséklet,
- UV-detektálás 280 nm-en.





## A zsírolható vitaminok szétválasztása HPLC-vel

1. menadion (K<sub>3</sub>-vitamin),
2. retinol (A-vitamin),
3. retinol-acetát,
4. menaquinon (K<sub>2</sub>-vitamin),
5.  $\delta$ -tokoferol,
6. ergo-kalciferol (D<sub>2</sub>-vitamin),
7. kole-kalciferol (D<sub>3</sub>-vitamin),
8.  $\alpha$ -tokoferol (E-vitamin),
9. tokoferol-acetát,
10. fillo-quinon (K<sub>1</sub>-vitamin).



## A B<sub>1</sub>-vitamin- (tiamin-) tartalom meghatározása

A módszer alkalmas dúsított élelmiszerekben a hozzáadott B<sub>1</sub>-vitamin meghatározására.

A módszer szerint a mintát hidegen zsírtalanítjuk, Selecton B<sub>2</sub> jelenlétében híg sósavval, majd koncentrált sósavval kezeljük.

Nitrogénatmoszférában, 80–90 °C-os vízfürdőn, fény kizárása mellett oldjuk.

Hígítás és szűrés után lúgos közegben tiokrommá oxidáljuk.

A meghatározást HPLC-vel, spektrofluorimetriás detektálással, a mintával azonos módon elkészített tiamin-klorid-hidroklorid standardoldathoz viszonyítva végezzük.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A minta zsírtalanítása

A várható B<sub>1</sub>-vitamin-tartalomtól függően 2,5–10 g mintát mérünk be egy 250 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer-lombikba.

100 cm<sup>3</sup> 0,1 mólos sósavval szuszpendáljuk, majd még 1 cm<sup>3</sup> tömény sósavat adunk hozzá.

Amennyiben a minta zsírtartalma magas, úgy a mintát egy tölcséren lévő szűrőpapírra tesszük, és több részletben kb. 100 cm<sup>3</sup> n-hexánnal vagy petroléterrel atmossuk, és száradni hagyjuk.

Ezt követően 80–90 °C-os vízfürdőn, visszafolyós hűtéssel, fénytől védve 30 percig oldjuk.

Az oldás után lehűtjük, szűrés nélkül 200 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba visszük, jelig töltjük, alaposan összerázzuk, majd ülepedni hagyjuk.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Oxidáció

Az oldat tisztáját  $250 \text{ cm}^3$ -re hígítjuk, összerázzuk és szűrjük.

A szűrlet  $10 \text{ cm}^3$ -éhez oxidációs edényben  $5 \text{ cm}^3$  oxidálóoldatot adunk.

Az oxidálóoldat 2%-os kálium-ferricianid és 30%-os NaOH-oldat 1:1 arányú elegye.

Ezt követően hozzáadunk  $0,5 \text{ cm}^3$  tömény foszforsavat és lehűtjük.

A mintaoldatból  $20 \text{ cm}^3$ -t C18-as tisztítóoszlopon préselünk keresztül, és az így megtisztított oldatból injektálunk  $20 \mu\text{l}$ -t a C18-as töltetű analitikai oszlopra.

## Elválasztás

A B<sub>1</sub>-vitamin oxidált származékát metanol : foszfát puffer elegyével eluáljuk, majd fluoreszcenciás detektálással 320 nm-es extinkciós és 424 nm-es emissziós hullámhossznál határozzuk meg a B<sub>1</sub>-vitamin mennyiségét.

A kalibráció során az oxidációs edénybe tiamin-klorid-hidrokloridot tartalmazó standardoldatot mérünk, és a mintához hasonlóan oxidáljuk, tisztítjuk és kromatografáljuk őket.



## A nikotinsavamid meghatározása

A módszer alkalmas az élelmiszerekhez hozzáadott nikotinsavamid-tartalom meghatározására.

Az eljárás során a mintát metanol : foszfát puffer eleggyel extraháljuk.

Az extraktum szűrése és centrifugálása után a nikotinsavamid-tartalmat folyadékkromatográfiásan határozzuk meg ionpárpépzéssel.

A detektálást 254 nm-en UV-detektorral végezzük.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A meghatározás menete

A nikotinsavamid-tartalmától függően 1–5 g mintát alufóliával bevont Erlenmeyer-lombikba mérünk be.

Hozzáadunk 100 cm<sup>3</sup> extrahálószeret (15 cm<sup>3</sup> metil-alkohol és 85 cm<sup>3</sup> 1%-os foszfátpuffer elegye).

Az extrakciót 3 x 5 perces ultrahangozással végezzük.

Az extrahálás után a mintát leszűrjük, és 10 cm<sup>3</sup>-t pipetázunk belőle egy centrifugacsőbe, centrifugáljuk, szükség esetén hígítjuk.

Az előkészített anyagból 50 µl-t injektálunk a HPLC-be.

Az elválasztást 25 cm hosszú, fordított fázisú, C18 típusú oszlopon végezzük.

A mozgófázis 1 literre 1 g n-heptánszulfonsav-nátriumot, 125 cm<sup>3</sup> metil-alkoholt és 875 cm<sup>3</sup> 1%-os foszfátpuffert tartalmaz.



A nikotinsavamid csúcsot 254 nm-en detektáljuk.

## **A C-vitamin-tartalom meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával**

A módszer alkalmas élelmiszerek C-vitamin-tartalmának meghatározására.

A homogén laboratóriumi mintát metanol–foszfát puffer eleggyel extraháljuk.

A leszűrt oldatot nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal analizáljuk, elektrokémiai detektálást alkalmazva.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A meghatározás menete

A mintából 1–10 g anyagot mérünk be egy 250 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer-lombikba, és 50–100 cm<sup>3</sup> extrahálószerrel extraháljuk.

Az extrahálószer 350 cm<sup>3</sup> metanolból és 650 cm<sup>3</sup> 0,01 mólos KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-oldatból áll, melynek pH-ját 1 mólos foszforsavval 3,0-ra állítjuk be.

A lombikot alufóliával bevonjuk; 30 perces rázatás után a lombik tartalmát vákuumban leszűrjük.

A szilárd maradékot 5 cm<sup>3</sup> extrahálószerrel mossuk, a szűrlet térfogatát feljegyezzük, és a tiszta oldatból 20–50 µl-t injektálunk a HPLC készülékbe.

A kromatografálásra Spherisorb 5 ODS 250 x 4,6 mm-es oszlopot használunk, a detektor ED 101 E elektrokémiai detektor.

Az eulens 350 cm<sup>3</sup> metanolt, 650 cm<sup>3</sup> 0,01 mólos KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-oldatot és 2 cm<sup>3</sup> decilamint tartalmaz.



## Vízoldható vitaminok meghatározása egy lépésben

A vízoldható vitaminok a megfelelően megválasztott folyadékkromatográfiás körülmények között HPLC-vel egymástól szétválaszthatók.

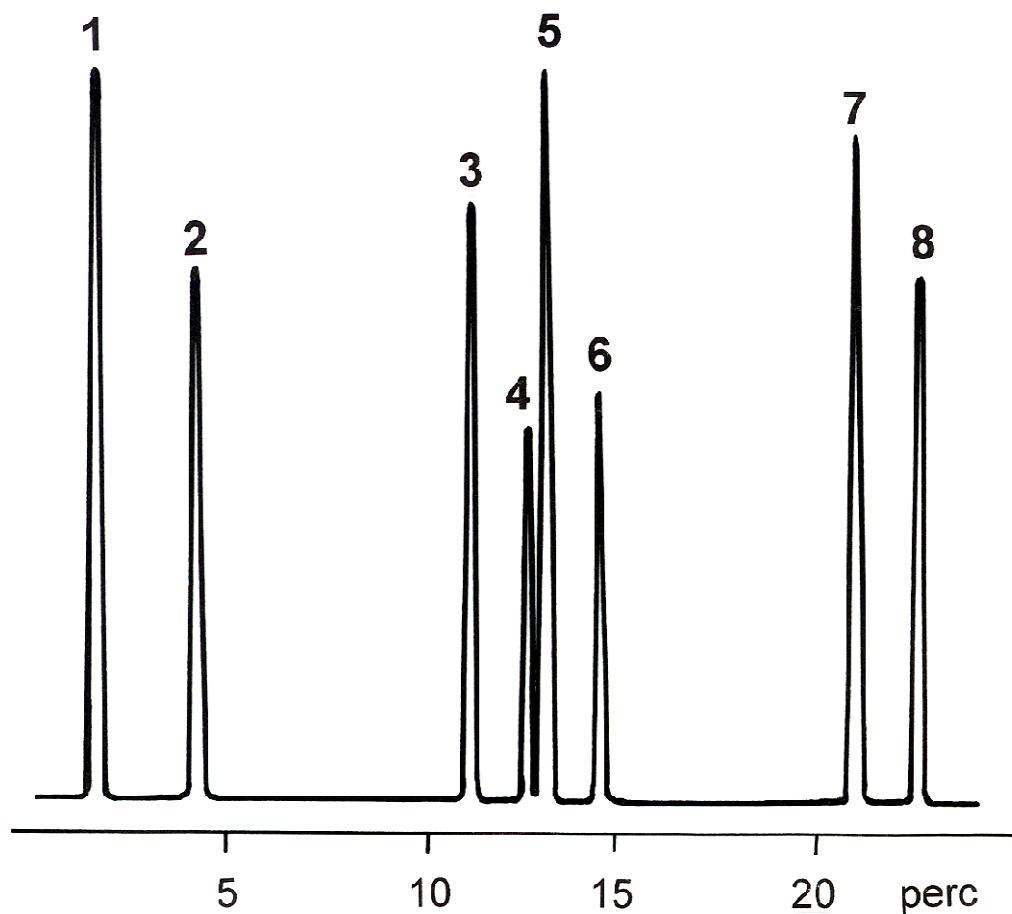
A meghatározás során CROM-SIL 120 ODS 5-ST, 5  $\mu\text{m}$  töltetű, 150 x 4 mm-es oszlopot használtunk.

Az eluens 6,6-os pH-jú, 20  $\mu\text{M}$  koncentrációjú  $\text{K}_3\text{PO}_4$ -oldat.

Az áramlási sebesség 8  $\text{cm}^3/\text{perc}$ , a nyomás 9 MPa, a hőmérséklet 30 °C, a detektálást pedig 254 nm-en végezzük.



## Vízdoldható vitaminok meghatározása HPLC-vel



1. L-aszkorbinsav (C-vitamin),
2. nikotinsav,
3. piridoxin-hidroklorid (B<sub>6</sub>-vitamin),
4. nikotinsavamid,
5. tiamin-hidroklorid (B<sub>1</sub>-vitamin),
6. folsav,
7. ciano-kobalamin (B<sub>12</sub>-vitamin),
8. riboflavin (B<sub>2</sub>-vitamin).



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az U-vitamin-tartalom meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával

A módszer alkalmas élelmiszerek, elsősorban növényi anyagok sejtnedvei U-vitamin-tartalmának meghatározására.

Az U-vitamint tartalmazó anyagot 2,2 pH-jú citrátpufferben végzett homogénezés után 12 órán át, 4–5 °C-on hűtőszekrényben tároljuk.

A homogenizátumot szűrjük és a szűrletből meghatározzuk az U-vitamint (S-metil-metionin-szulfonium-klorid, a továbbiakban SMM).

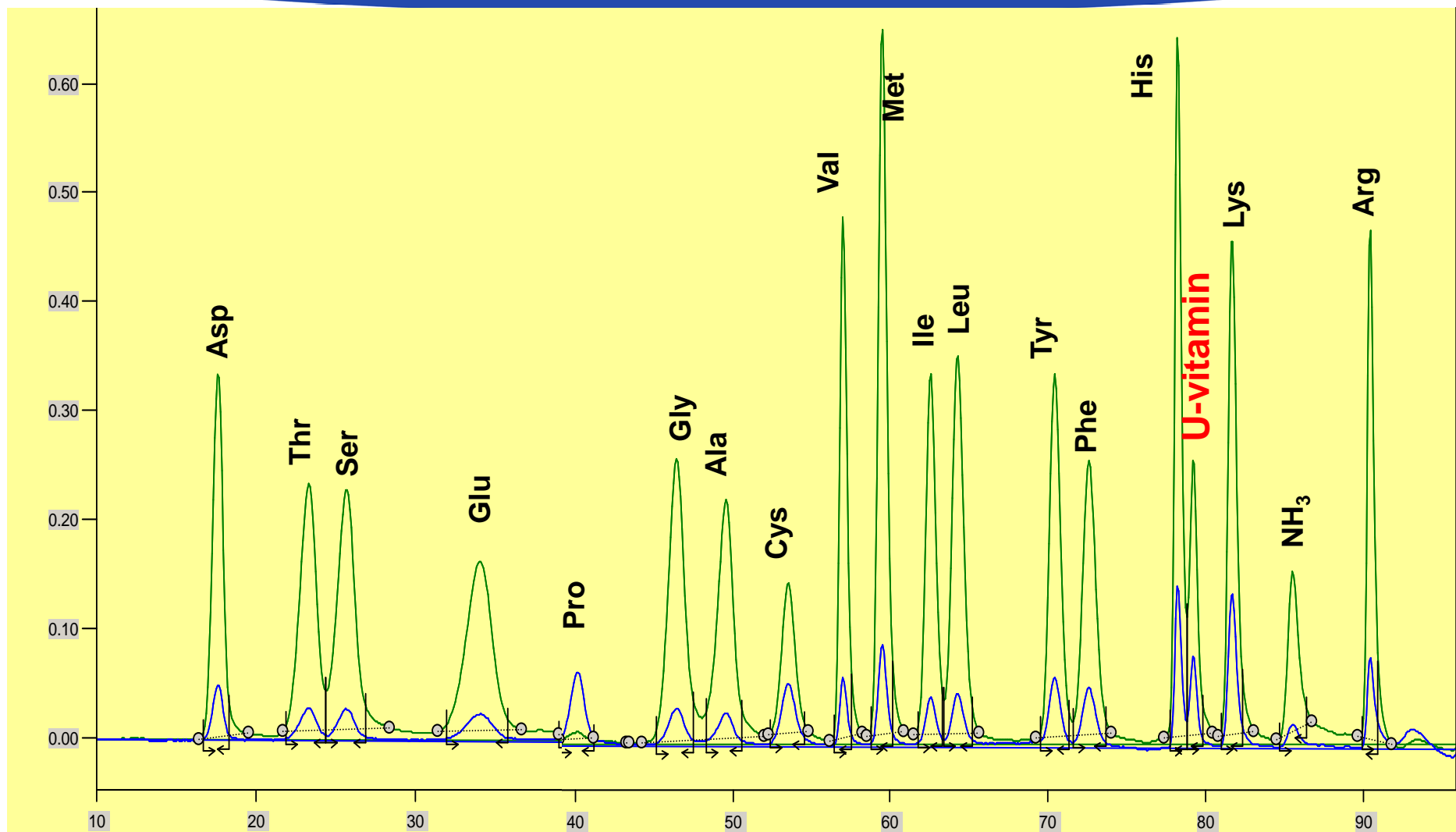
A módszerrel az SMM elválasztható a többi szabad aminosavtól, és mennyisége az ioncserés oszlopkromatográfia adta pontossággal meghatározható.





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Az U-vitamin elválasztása a fehérjealkotó aminosavaktól



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A meghatározás menete

A friss növényi mintából 30 g-ot homogenizáló-berendezésbe mérünk be, hozzáadunk 30 cm<sup>3</sup> 2,2 pH-jú Na-citrát puffert.

5 percig intenzíven homogenizáljuk, majd további 12 óráig hűtőszekrényben tároljuk.

A rostos részeket szűréssel eltávolítjuk, a szűrőn maradt anyagot 2 x 2 cm<sup>3</sup> pufferrel átmossuk.

A szűrletet lapos fenekű kristályosító csészékbe öntjük, és 10 cm<sup>3</sup>-re besűrítjük.

Az így kapott sűrítményből megfelelő hígítás után viszünk fel az ioncserélő oszlopra.

Az U-vitamin a bázikus aminosavak között, az alkalmazott pufferrendszer függvényében a lizin előtt vagy után jelenik meg a kromatogramon.

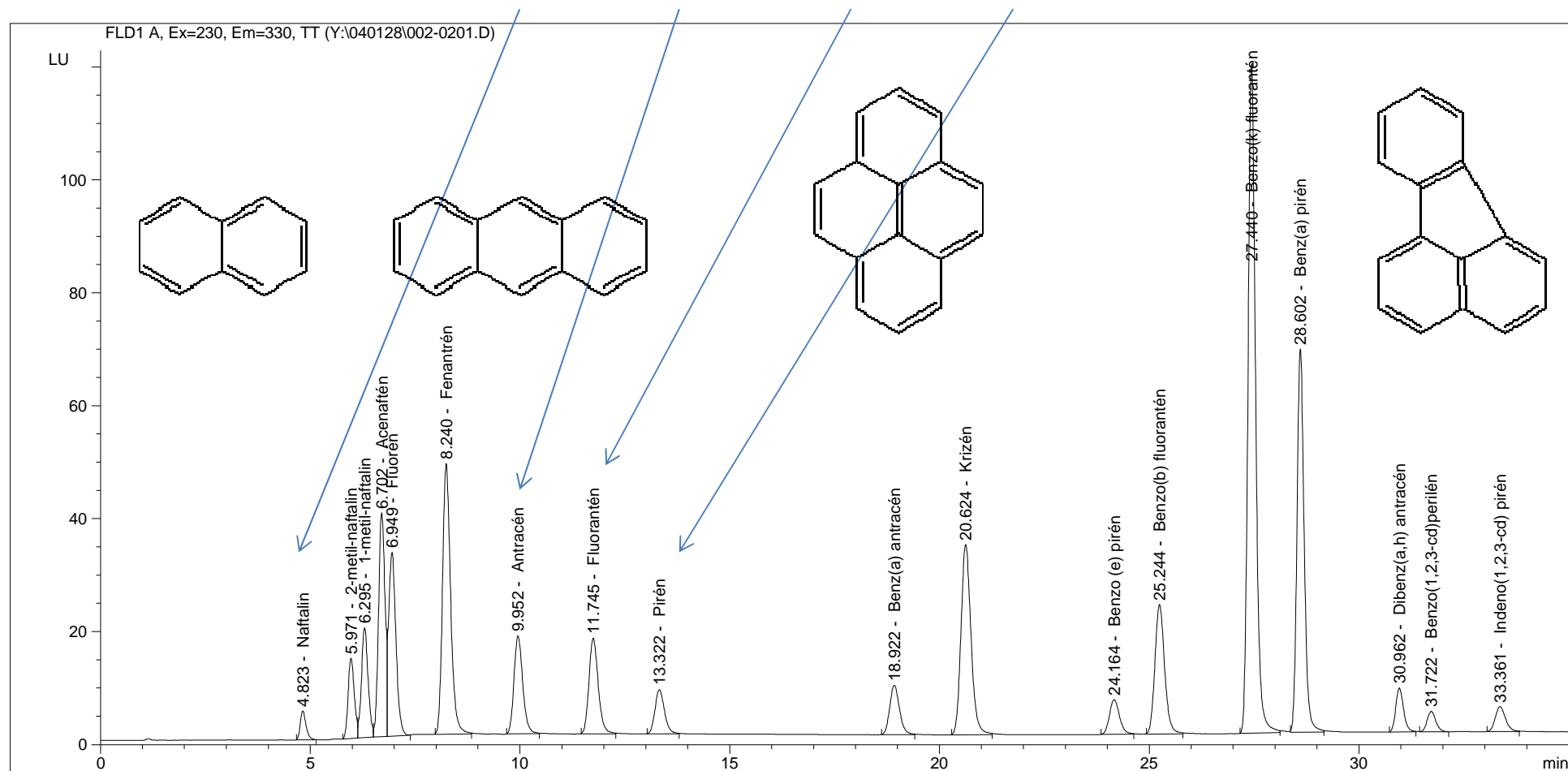


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Poliaromás szénhidrogének – PAH-ok szétválasztása HPLC-vel

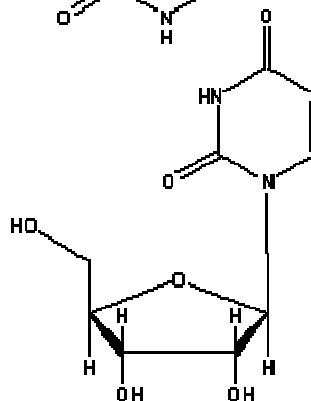
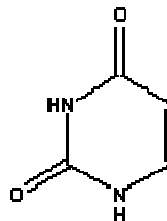
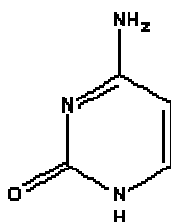
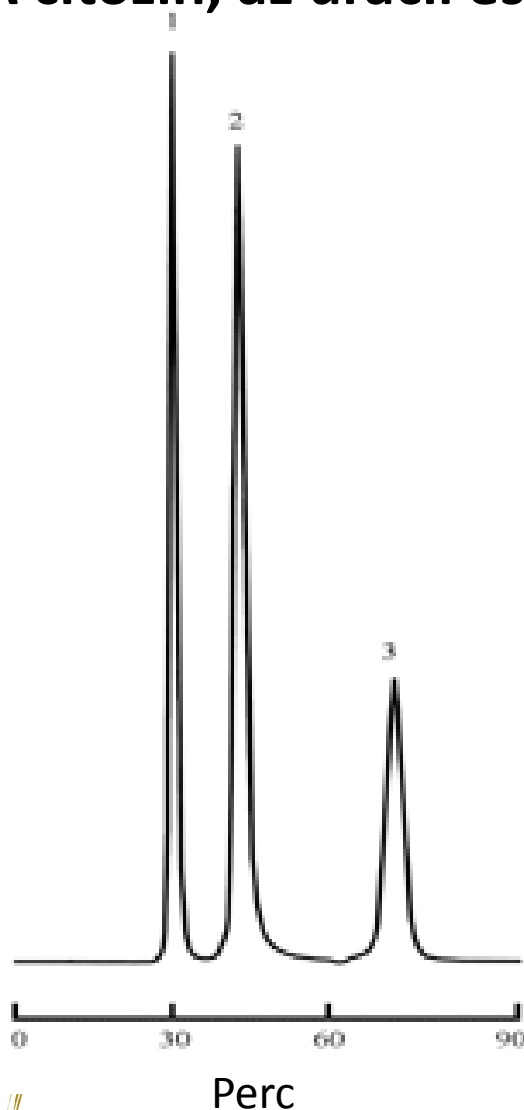
Oszlop: LiChrosphere® PAH (5mm); 250x3 mm; Hőmérséklet: 20°C; Eluens: AcN:víz.

Naftalin-antracén-fluorantén-pirén



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A citozin, az uracil és az uridin szétválasztása poli(sztírol-divinilbenzol) HPLC oszlopon



Oszlop: PRP-1, 4.1 x 50 mm, 3  $\mu$ m

1. Cytosine

2. Uracil

3. Uridine

**Körülmények:** 0.05 M Citromsav pH 4.2.

Izokratikus. Szobahőmérséklet.

**Áramlás:** 1 mL/min.

**Injektált térf.:** 10  $\mu$ L

**Detektálás:** UV - 254 nm

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

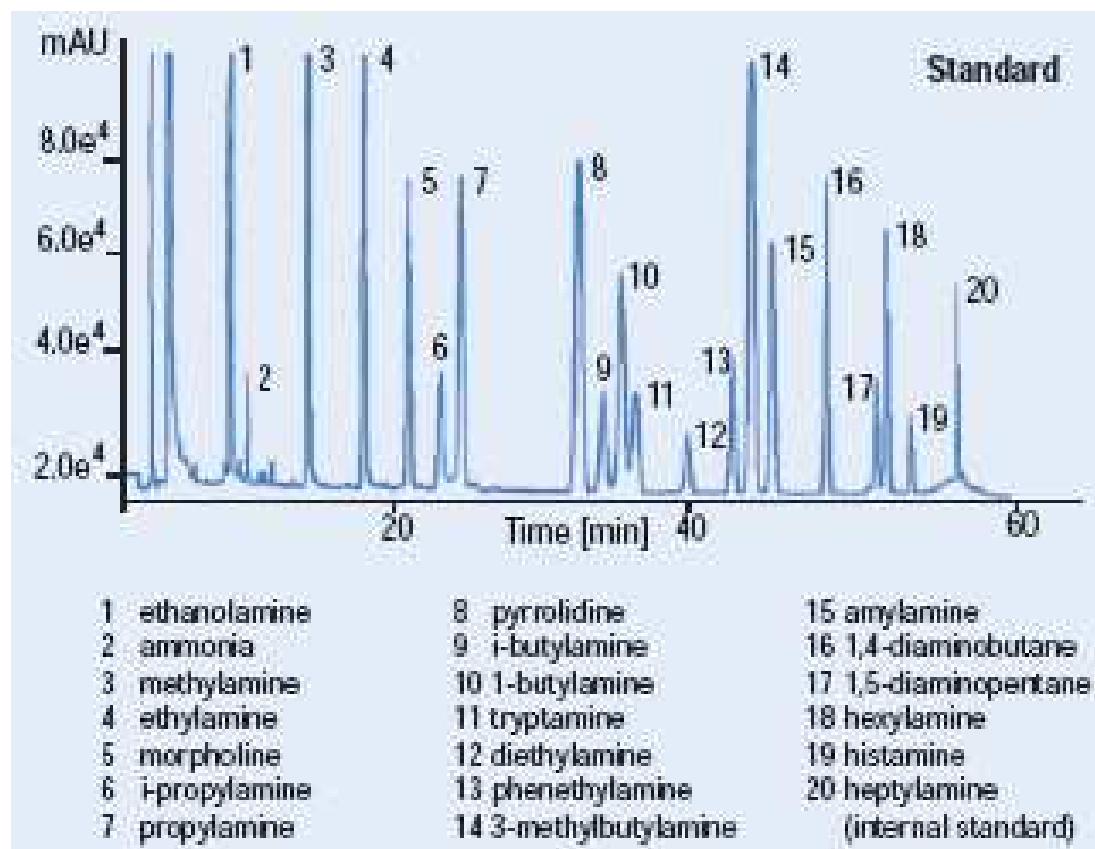
## Biogén aminok meghatározása borokból oszlop előtti származékképzéssel

### Mintaelőkészítés:

A bor színtelenítése és a pH beállítása után az aminosav származékokat danzil-klorid oldattal képezték, és a származékok szilárd fázisú extrakciója után C18 oszlopon, víz-acetonitril eleggyel választották szét a biogén aminokat.

Oszlop: 250 x 4,6 mm,  
SpherisolbODS2 5 $\mu$ m,

Detektor: UV 250nm.

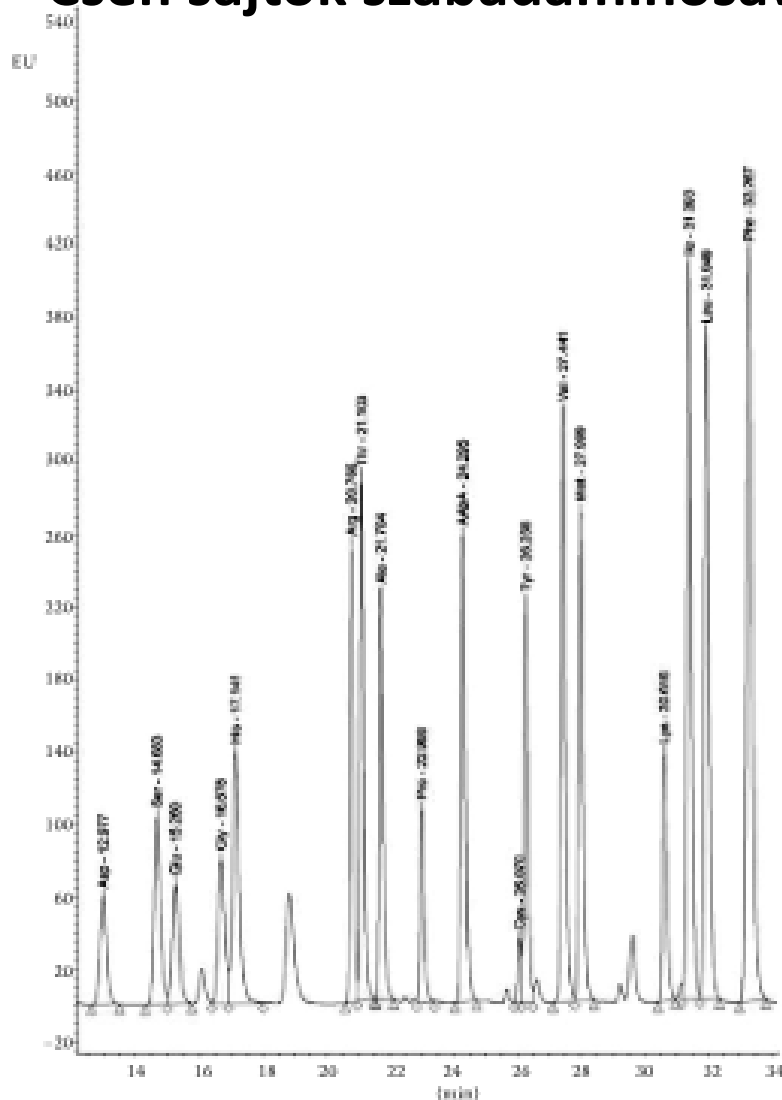


Busto et al.: Solid phase extraction applied to the the dermination biogenic amines in wines by HPLC. *Chromatographia*. 1994. 38. 9/10. 571-578.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Cseh sajtok szabadaminosav tartalmának meghatározása HPLC-vel



**Az aminosavak elúciós sorrendje:** Asp, Ser, Glu, Gly, ammónia, Arg, Thr, Ala, Pro,  $\alpha$ -amino-vajsav belső standard, (AAbA), Cys, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu, Phe.

**Készülék:** Waters Alliance 1695 HPLC.

**Detektor:** 2475 Multi  $\lambda$  fluoreszcens detektor (ex: 250 nm, em: 395 nm).

**Oszlop:** 150 x 3,9 mm, 4  $\mu$ m, Nova-Pack C<sub>18</sub>.

Eluensek: Gyári, nincs összetétel.

**Oszlop előtti származékképzés** 6-aminokinolil-N-hidroxi-szukcinimid karbamáttal.

Kabelova et al.: Determination of free amino acids in cheeses from the Czech market. Czech. J. Food. Sci.: 27. 2009. 3. 143-150.

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A D- és az L-aminosavak nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározása oszlop előtti származékképzéssel

**Készülék:** HP-1090 Series L.

**Származékképzés:** orto-ftálaldehid/ N-izobutil-L(vagyD)-cisztein. (OPA/IBLC vagy OPA/IBDC).

**Oszlop töltete:** 250 mm x 4 mm Hypersil ODS 5 $\mu$ m szemcseméret (oktadecilszilil származék).

**Mozgó fázis:** Lineáris gradiens pH=5,95, 12 mM nátrium acetátból, metanolból és acetoinitrilből képezve.

**Detektálás:** Fluoreszcenciás detektor, emisszió: 230 nm, extinkció: 445 nm.

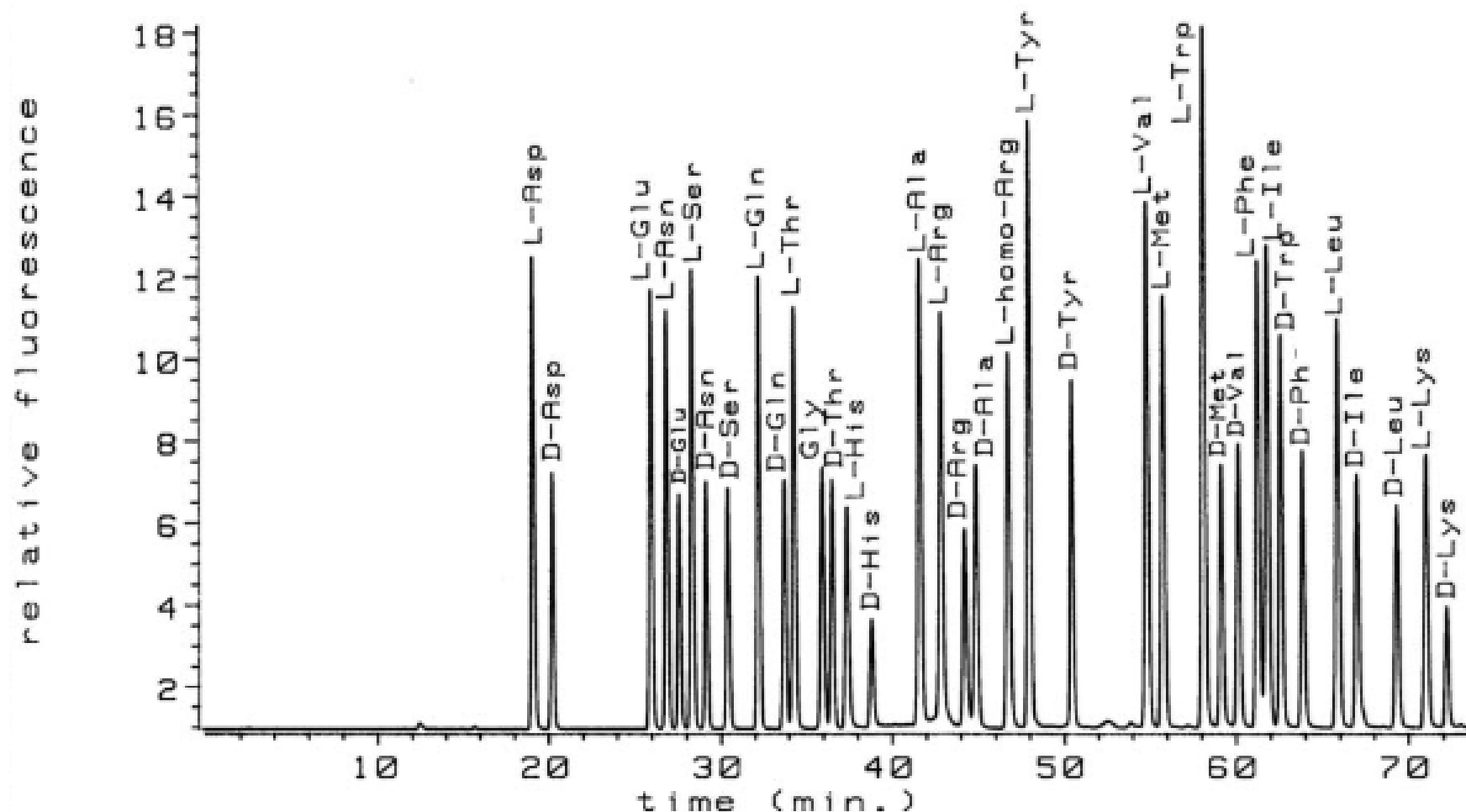
Vizsgált anyagok: almafa levele, talaj az almafa környékéről, alma dzsúsz.

Bückner & Westhauser: Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids*. 2013. 24. 43-55.



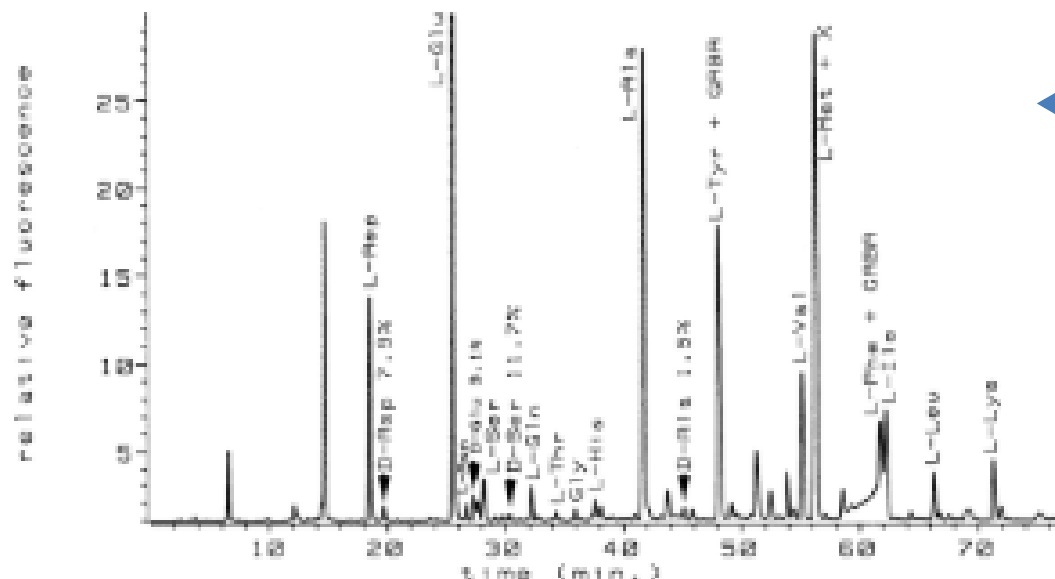
# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

A D- és az L-aminosavak standard kromatogramja OPA/IBLC (o-ftáldialdehid/N-izobutil-L-cisztein) származékképzés után HPLC-vel. Az L-aminosavak és a Gly koncentrációja 100, a D-aminosavaké 50 pmol. Fluoreszcens detektálás 230 nm em. és 445 nm ex. hullámhossznál.



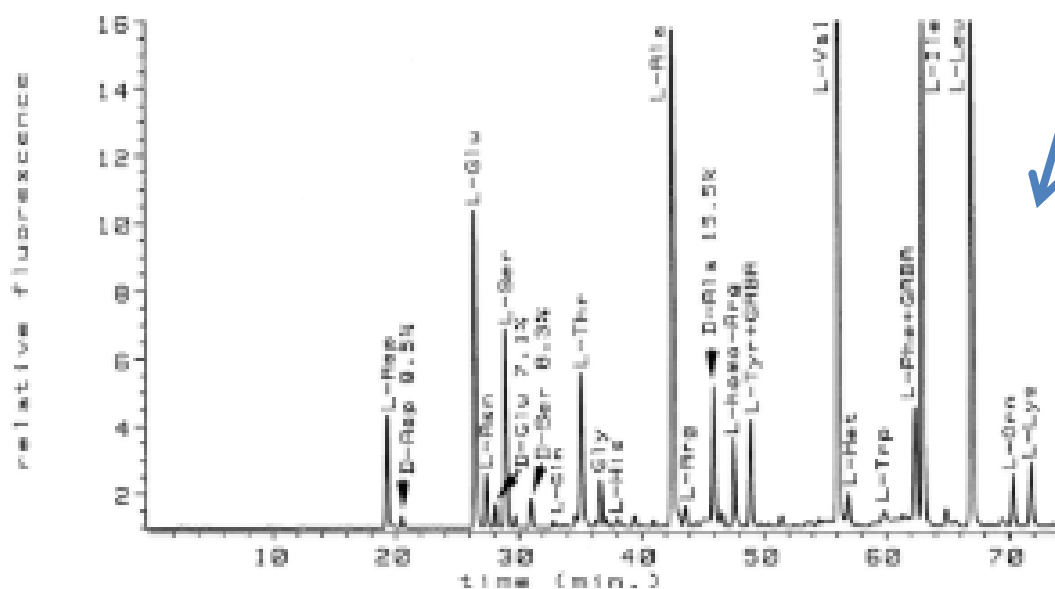


# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



**A Golden Delicious almafa  
leveleinek, és a körülötte lévő  
talaj szabad aminosav  
tartalmának meghatározása  
HPLC-vel OPA/IBLC oszlop előtti  
származékképzéssel.**

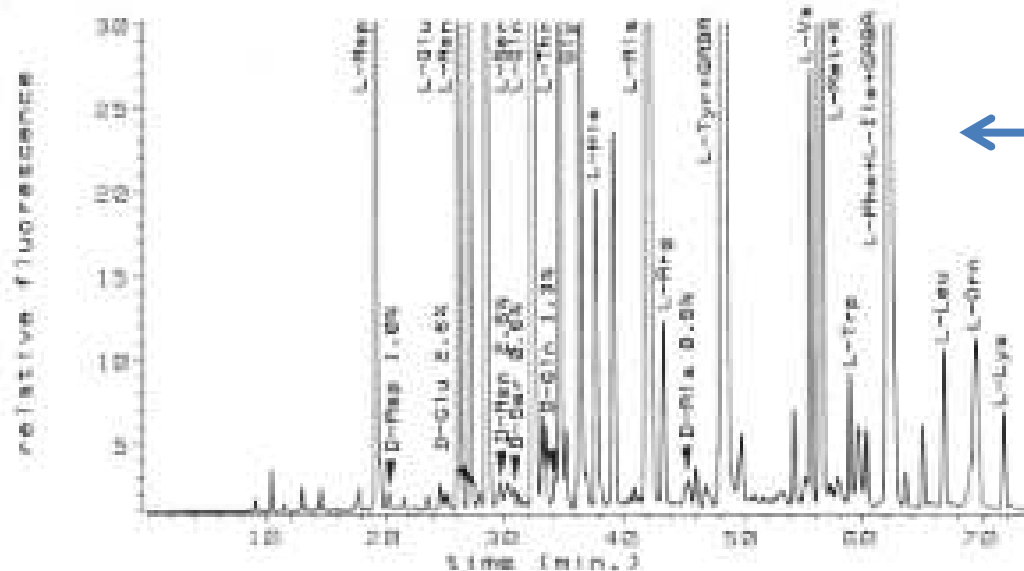
**CPA/IBLC (o-ftálaldehid/N-izobutil-L-cisztein)**



**Bückner & Westhauser: Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. Amino Acids. 2013. 24. 43-55.**

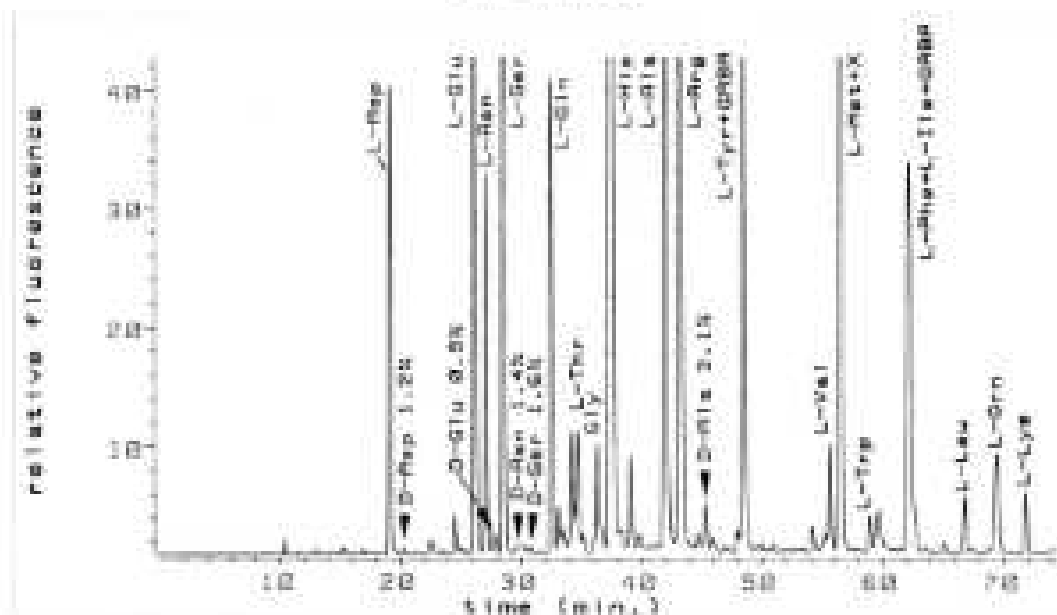
TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



← A gliko és a metasequoia fa levelei szabad aminosav tartalmának meghatározása HPLC-vel OPA/IBLC oszlop előtti származékképzéssel.

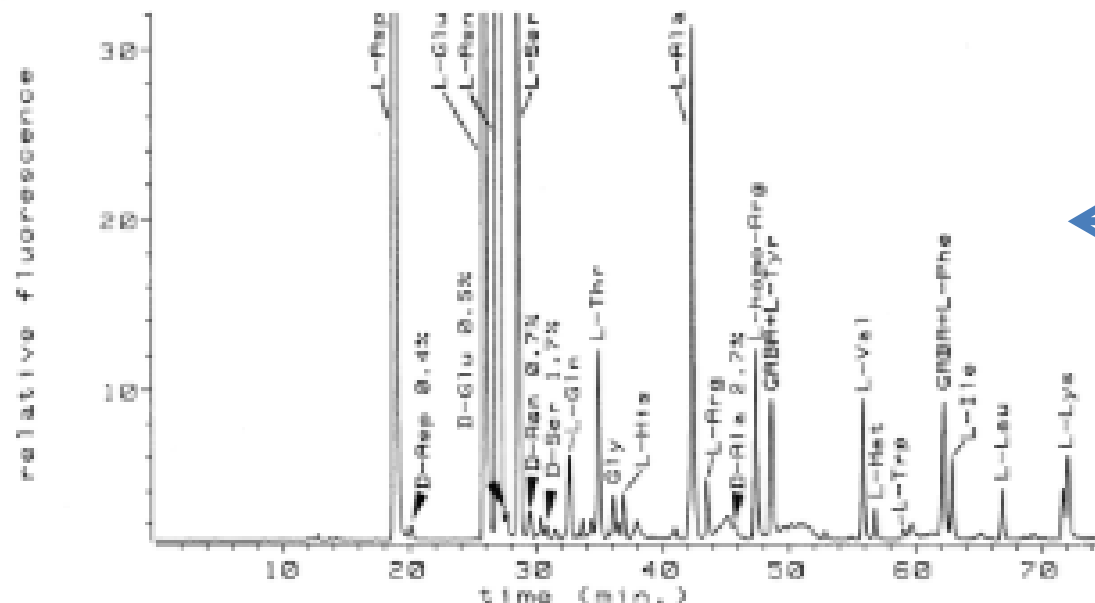
OPA/IBLC (o-ftáldiimid/N-izobutil-L-cisztein)



← Bückner & Westhauser: Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. Amino Acids. 2013. 24. 43-55.

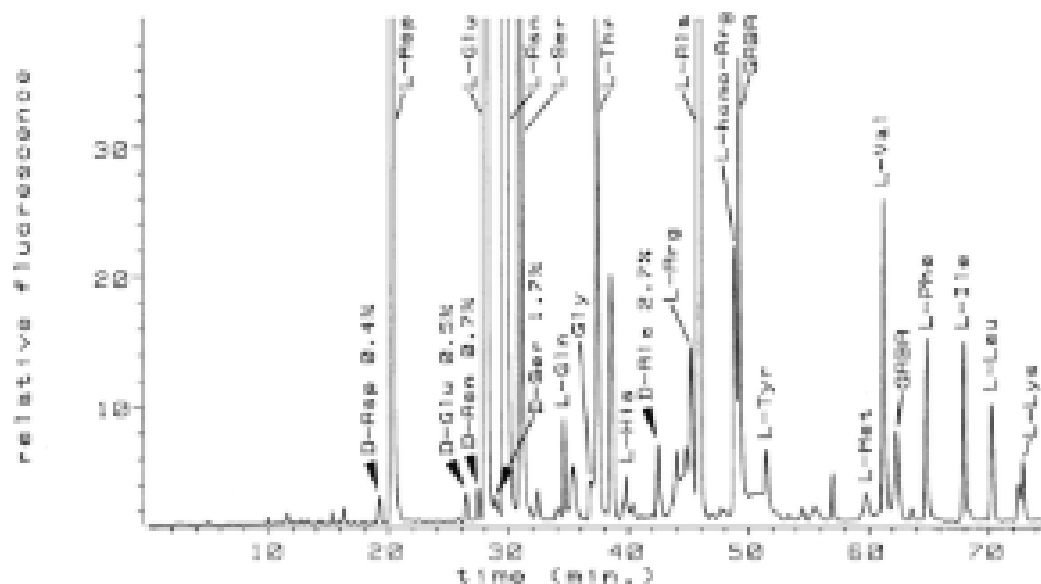
TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



A Golden Delicious almafajta levének szabad D-aminosav tartalma OPA/IBLC és OPA/IBDC származékképzés után HPLC-vel. A GABA ( $\gamma$ -amino-vajsav) két származékot ad. A nyilak a D-aminosavakat jelölik

OPA/IBLC (o-ftáldialdehid/N-izobutil-L-cisztein)



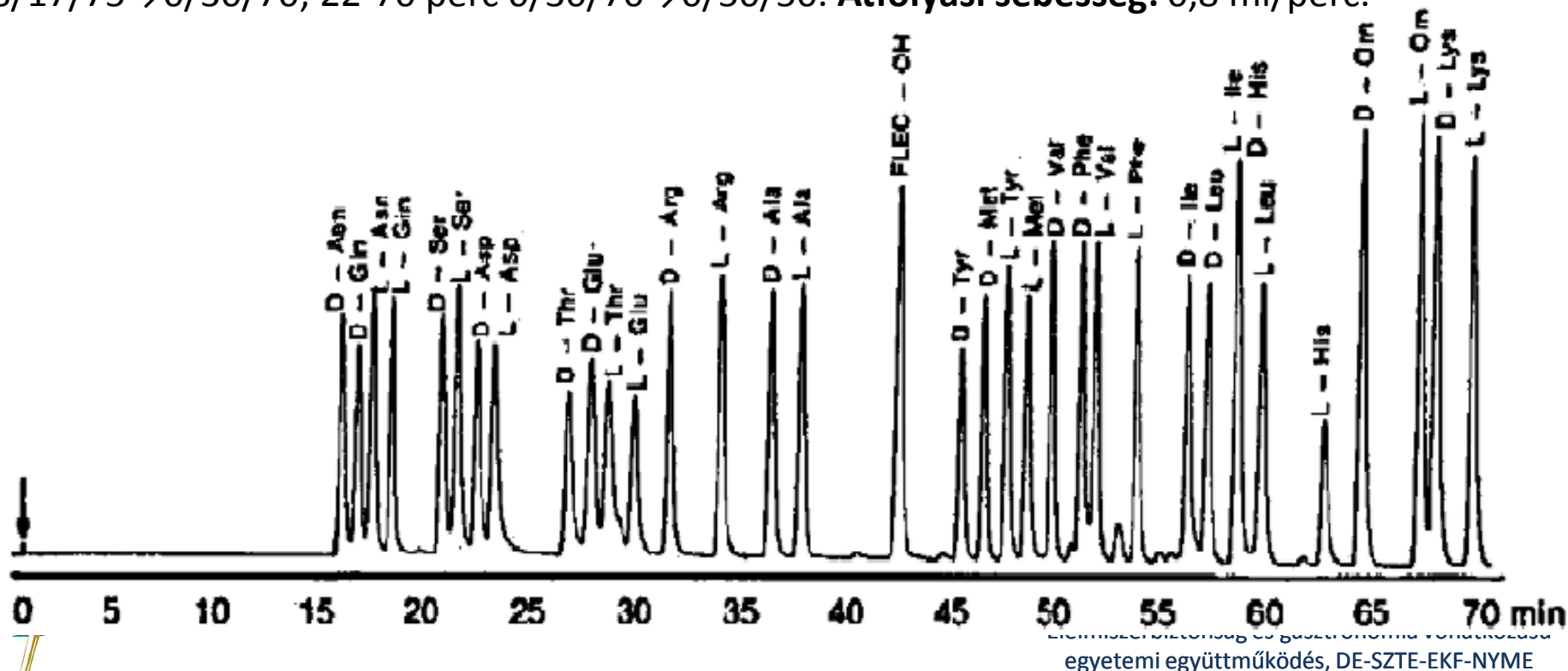
Bückner & Westhauser: Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. Amino Acids. 2013. 24. 43-55.

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

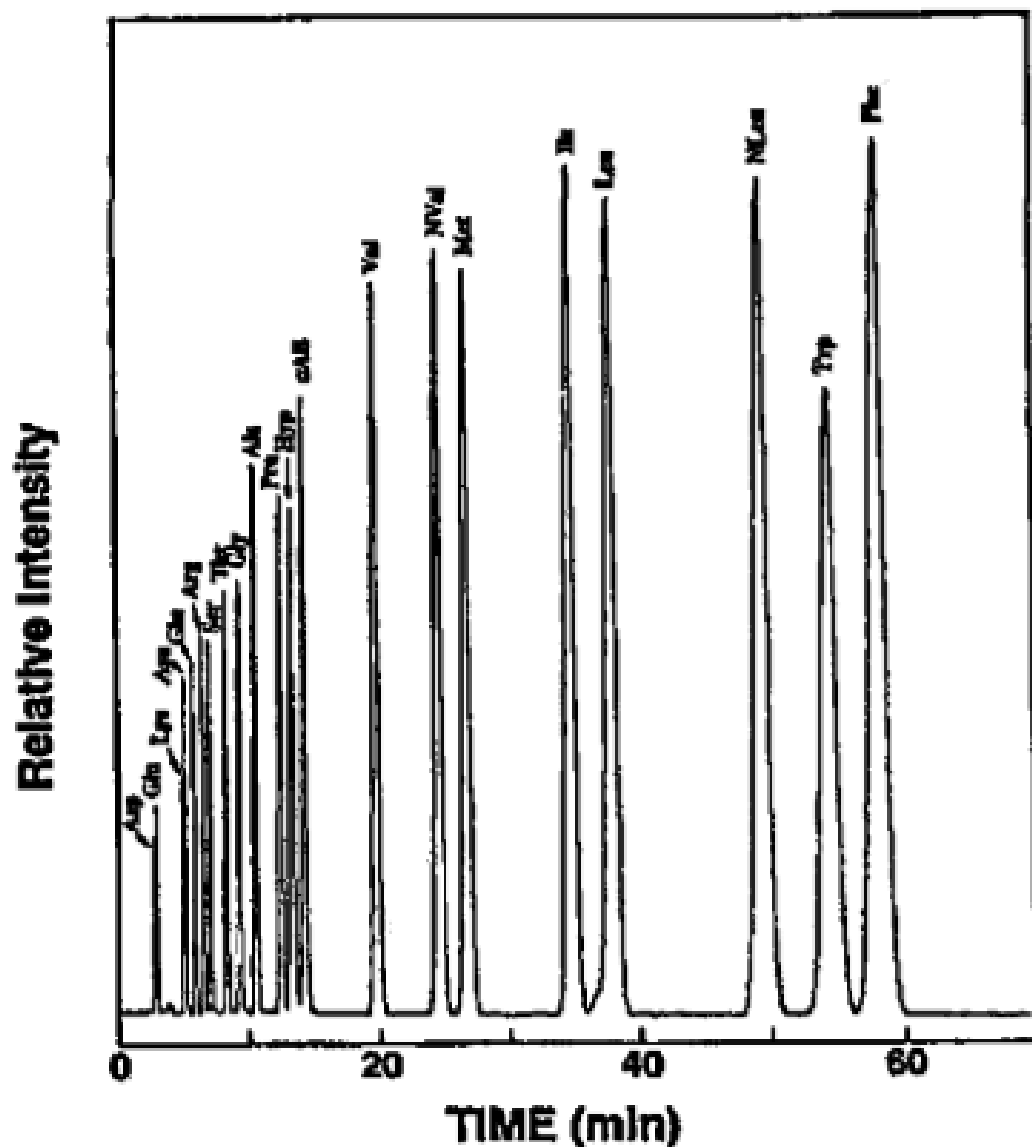
# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## A D- és L-aminosavak (+)-1-(9-fluorenil)etil kloroformát származékai szétválasztása RP-HPLC-vel

**Oszlop:** 150 x 4,6 mm 3 µm Spherisorb oktil. **Mozgó fázis:** A: ecetsav pH 4,35, B: Acetonitril, C: tetrahydrofurán. **Gradiens:** 0-8 perc 8% ACN/17%THF/75% puffer (8/17/75); 8-22 perc 8/17/75→0/30/70; 22-70 perc 0/30/70→0/50/50. **Átfolyási sebesség:** 0,8 ml/perc.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA



## A danzil aminosavak fluoreszcenciás meghatározása HPLC-vel

Oszlop: ODS, 150 x 4,6 mm.

Mozgó fázis: 22%-os acetonitril 40 mM, pH 7,20 ammónium acetátban.

Áramlási sebesség: 1 ml/perc.

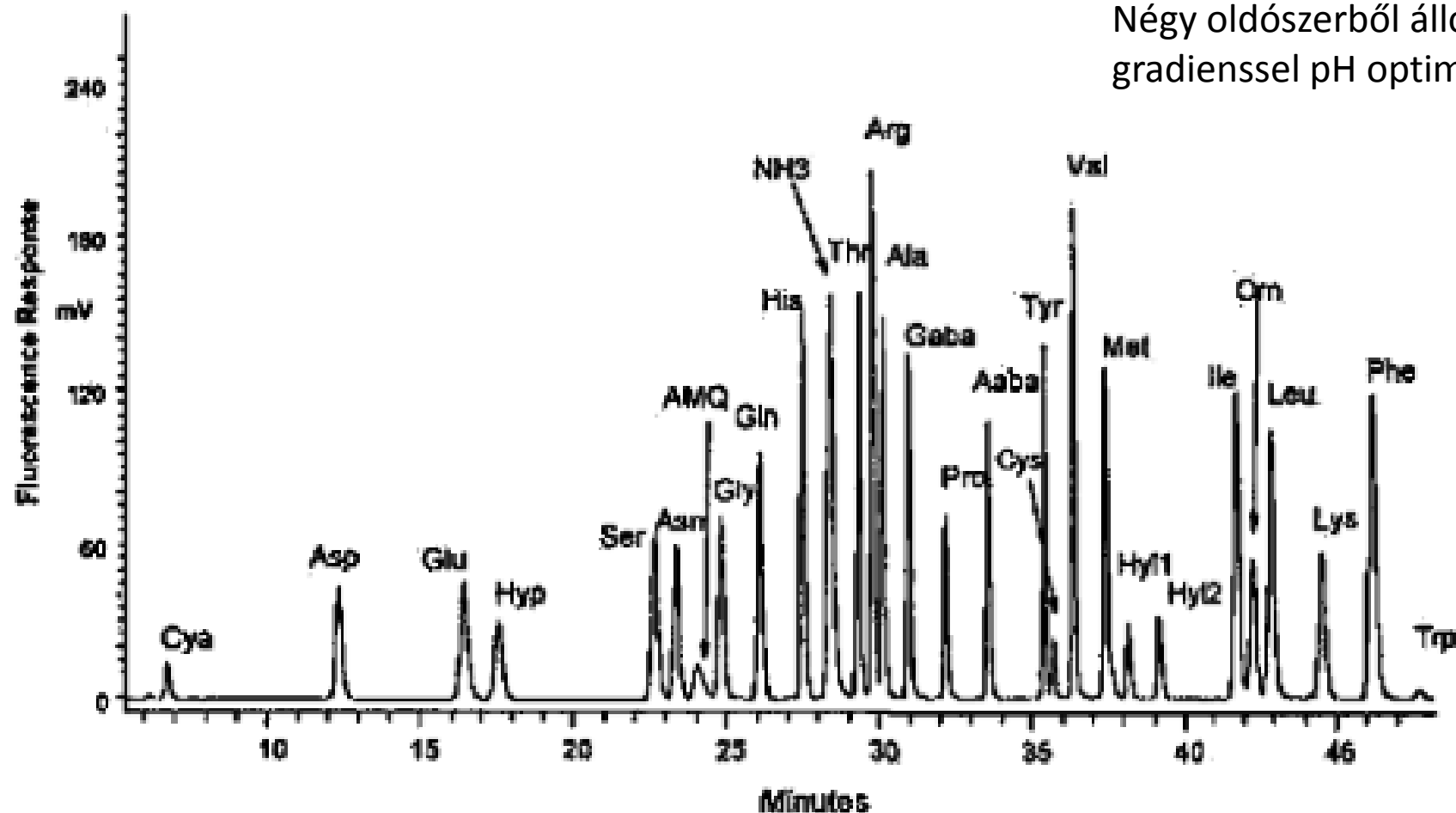
Detektálás: ex. 335, em. 522 nm-en.

Az analizált minta: 0,21 pM danzil aminosav.

# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

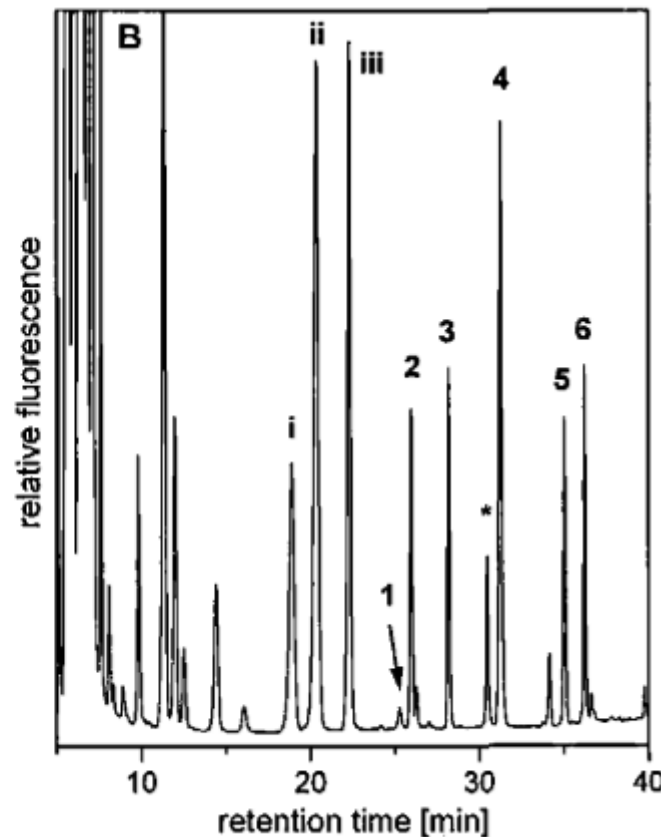
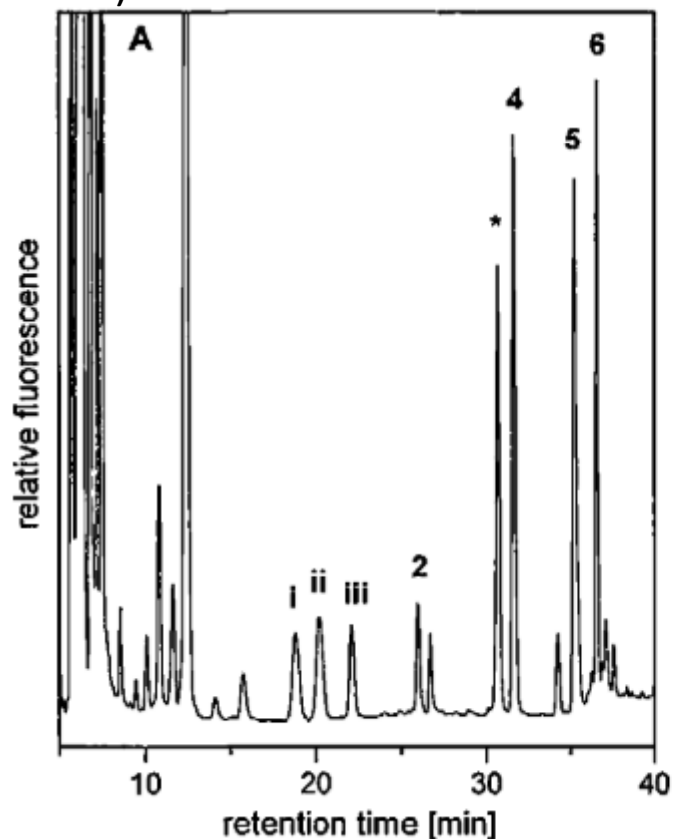
## Az aminosavak AQC (aminoquilonil-N-hidroxi-szukcinimidil karbamát) származékainak szétválasztása RP-HPLC-vel

Négy oldószerből álló  
gradienssel pH optimálás.



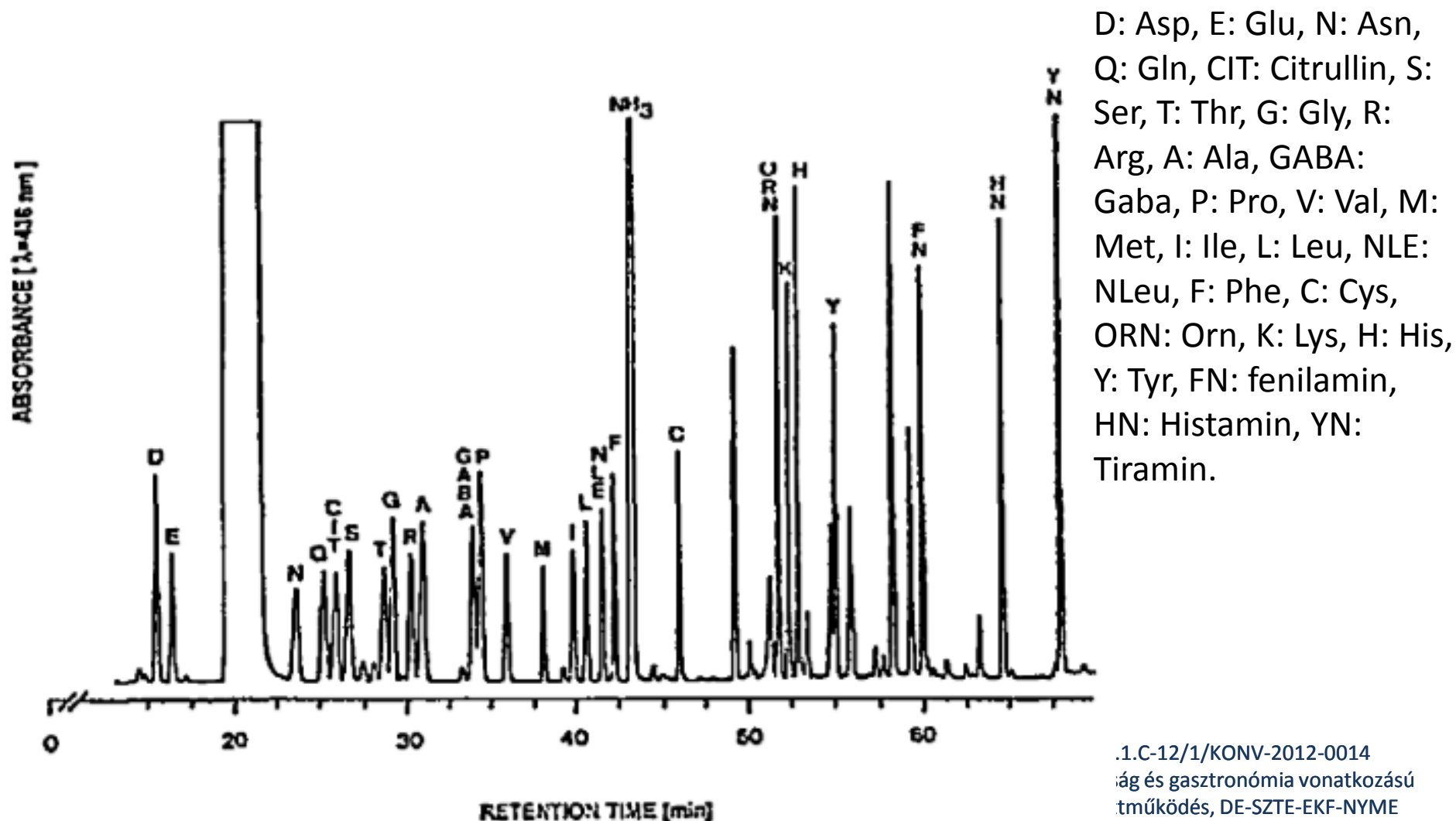
## Poliaminok szétválasztása HPLC-vel AQC-vel történő oszlop előtti származékképzés után

AQC: 6-aminoquinolil-N-hidroxi-szukcinimid karbamát, 1. N<sup>8</sup>-acetilspermidin, 2. putreszcin, 3. kadaverin, 4. spermidin, 5. 1,7 diaminoheptán belső standard, 6. spermidin és N,N'-bis(6-quinolil)karbamid. i-iii. különböző nemazonosított aminosavak a mintában.



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

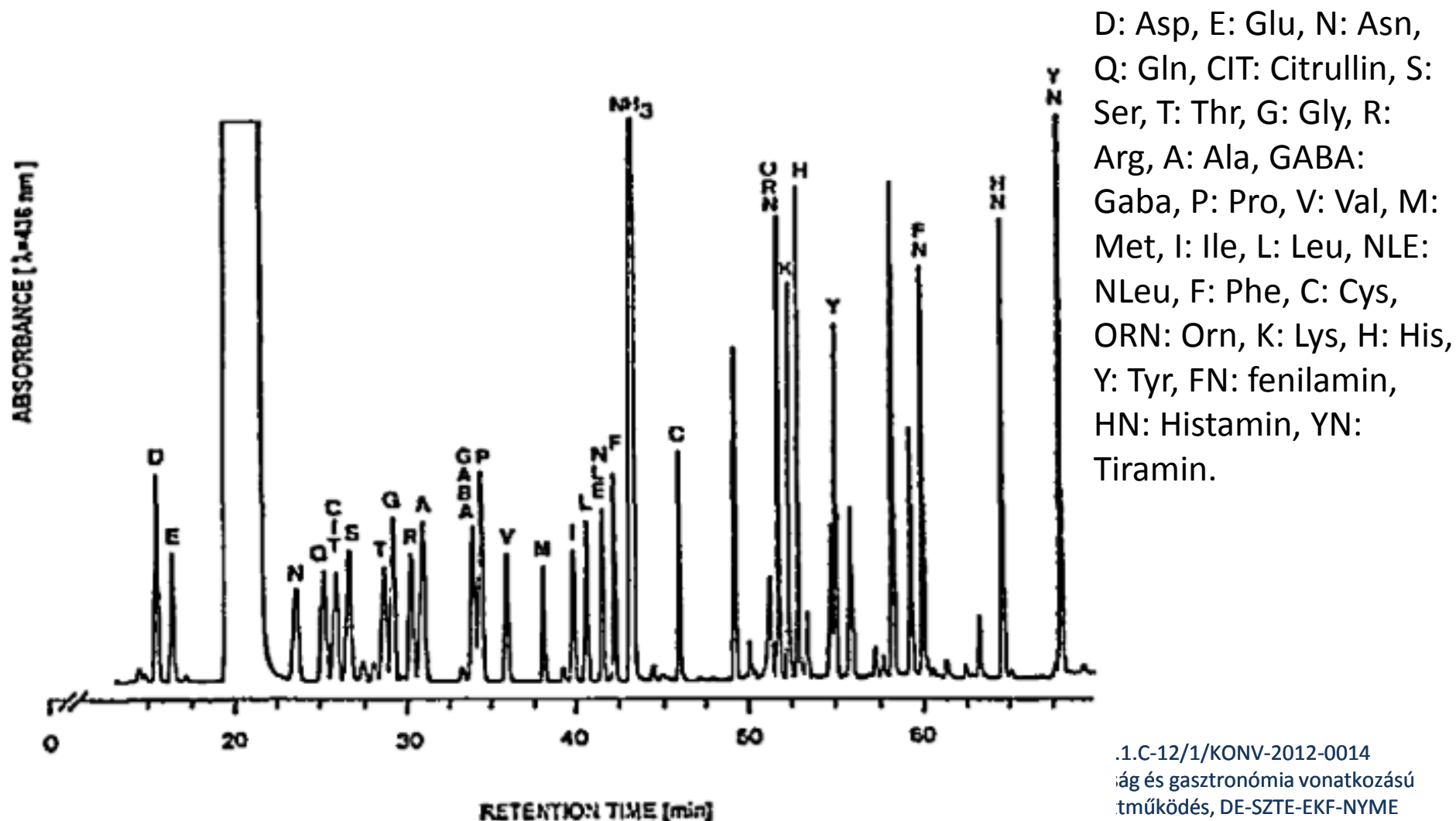
## Dabzil aminosav származékok és aminok meghatározása RP-HPLC-vel





# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

## Dabzil aminosav származékok és aminok meghatározása RP-HPLC-vel



## Rövidítések

**AC**, affinitás folyadékkromatográfia (affinity chromatography)

**APCI**, atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

**API**, légköri nyomáson működő, atmoszférikus ionizáció (Atmospheric Pressure Ionization)

**APPI**, atmoszférikus nyomású fotoionizáció (Atmospheric Pressure Photoionization)

**CC**, királis folyadékkromatográfia (Chiral Chromatography)

**CD**, vezetőképesség detektor (Conductivity Detector)

**CI**, kémiai ionizáció (Chemical Ionization)

**ECD**, elektrokémiai detektor (Electro-Chemical Detector)

**EI**, elektronütköztetési ionizáció (Electron Impact)

**ELSD**, elpárologtatással egybekötött fényszórásos detektor (Evaporative Light Scattering Detector)

**ESI**, elektropray ionizáció (Electrospray Ionization)

**FLD**, fluoreszcenciás detektor (Fluorescent Detector)



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

**GC-MS**, gázkromatográf tömegspektrométerrel (GC Mass Spectrometry)

**GLC**, gáz-folyadék kromatográfia (Gas-Liquid Chromatography)

**GSC**, gáz-szilárd kromatográfia (Gas-Solid Chromatography)

**HPLC-MS**, HPLC tömegspektrométerrel (HPLC Mass Spectrometry)

**IEC**, ioncserés folyadékkromatográfia (Ion-Exchange Chromatography)

**IT**, ioncsapda tömeganalizátor (Ion Trap)

**LLC**, folyadék-folyadék kromatográfia (Liquid-Liquid Chromatography)

**LLOQ**, mérési alsóhatár (Lower Limit Of Quantitation)

**LOD**, kimutatási határ (Limit Of Detection)

**LSC**, folyadék-szilárd kromatográfia (Liquid-Solid Chromatography)

**MALDI**, mátrix segített lézer deszorpció és ionizáció (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

**MSD**, tömegspektrometriás detector (Mass Spectrometry Detector)

**NP-HPLC**, normál fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography)

**NSD**, nitrogén-kén detektor (Nitrogen-Sulphur Detector)



# ÉLELMISZEREK ÖSSZETÉTELÉNEK FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATA

**Q**, kvadrupol tömeganalizátor (Quadrupol Mass Analyser)

**RD**, radiokémiai detektor (Radiochemical Detector)

**RID**, törésmutató detektor (Refractive Index Detector)

**RP-HPLC**, fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (Reverse-Phase HPLC)

**RP-IP-HPLC**, fordított fázisú ionpár kromatográfia (Reverse-Phase Ionpair HPLC)

**SEC**, méretkizárásos folyadékkromatográfia (Size Exclusion Chromatography)

**SIM**, egy kiválasztott iont detektáló üzemmód (Single Ion Monitoring)

**TOF**, repülési idő analizátor (Time Of Flying)

**ULOQ**, mérési felsőhatár (Upper Limit Of Quantitation)

**UV-VIS**, ultraibolya-látható abszorbancia detektor (Ultraviolet-Visible Absorbance Detector)





DEBRECENI EGYETEM

# KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014  
Élelmiszerbiztonság és gasztronómia vonatkozású  
egyetemi együttműködés, DE-SZTE-EKF-NYME

SZÉCHENYI 2020



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

Európai Unió  
Európai Szociális  
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE